

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA DÉCOMPOSITION
DES CÉNAPSES LIPOPROTÉIQUES PAR LES SAVONS

par M. LE SAGET, A. DESASSIS et M. MACHEBOEUF.

(*Institut Pasteur. Paris.*)

Macheboeuf et Tayeau [1 à 5] ont montré qu'une forte proportion des lipides du sérum sanguin devient extractible par l'éther lorsque l'on ajoute au sérum une quantité convenable d'un savon.

Nous avons vérifié ce fait, puis poursuivi son étude. Au cours de ces recherches, il est apparu que le phénomène de libération des lipides par le savon présentait des modalités curieuses.

La quantité de lipides qui passe dans l'éther pour un volume donné d'un sérum en présence d'une quantité donnée d'un savon varie considérablement avec la forme du récipient dans lequel est réalisée l'expérience.

Lorsque Macheboeuf et Tayeau découvrirent le détachement des lipides par les savons, ils opérèrent toujours dans des conditions standardisées dans des boules à décanter toutes identiques ; l'influence de la forme des récipients ne pouvait donc pas leur apparaître et leurs conclusions sont exactes dans les conditions où ils opéraient.

Nous avons été amenés à utiliser des récipients de tailles diverses et ceci nous fit obtenir des résultats incohérents. En répétant les expériences et en discutant leurs résultats, l'influence de la forme des récipients nous est finalement apparue.

Nous ne décrirons pas tous les essais préliminaires qui nous ont amenés à cette conclusion. Envisageons simplement quelques

expériences montrant combien est grande l'influence des conditions de contact entre l'éther et le sérum additionné de savon.

EXPÉRIENCE I. — Pour cette expérience et pour toutes les autres que nous décrirons, les ampoules à robinet utilisées furent toutes identiques, mais on fit varier la position de ces ampoules dans le support qui les maintenait. De cette façon, la surface de contact entre éther et sérum différait dans de larges limites, ainsi que l'épaisseur de la couche du sérum. Ces ampoules étaient des cylindres de verre Pyrex terminés, d'une part, par un robinet et, d'autre part, par un bouchon rodé (voir fig. 1).

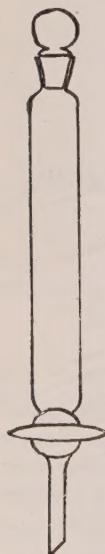


FIG. 1.

Suivant l'inclinaison de ces ampoules dans leur support, la surface de contact entre les deux phases variait considérablement.

Lorsque les ampoules étaient maintenues verticales, la surface de contact entre les deux phases était un cercle de 10,5 mm de rayon, donc de surface de 346 mm^2 .

Lorsque l'ampoule était inclinée, la surface était elliptique. Enfin, lorsque l'ampoule était couchée, la surface de contact était rectangulaire ; ses dimensions étaient : 21 mm \times 155 mm, soit 3255 mm^2 .

En position verticale, la couche de sérum avait une profondeur de 90 mm, tandis qu'en position couchée, elle n'avait que 10 mm.

En somme, en position couchée, l'épaisseur de la couche de sérum était à peu près neuf fois moins grande qu'en position debout, tandis que la surface de contact était à peu près neuf fois plus grande. Les volumes des deux phases étaient toujours les mêmes car, dans tous les cas, 20 ml de sérum étaient additionnés de 8 ml d'une solution de savon de titre connu et de 20 ml d'éther rectifié (distillé sur sodium).

A l'instant où l'ampoule est garnie de son contenu, on la renverse cinq fois lentement pour assurer l'homogénéité des phases, puis on la place dans son support dans la position qu'elle gardera pendant toute la durée de l'expérience, c'est-à-dire pendant cinq jours.

Les sérums utilisés étaient des sérums de chevaux provenant du Service de Sérothérapie de l'Institut Pasteur. Ces chevaux n'avaient pas subi d'immunisation, mais seulement quelques saignées.

Le savon était du dibromostéarate de potassium préparé par nous à partir d'acide oléique qui fut bromé par addition à froid.

Nous avons choisi ce savon, comme le firent Macheboeuf et Tayeau, afin de pouvoir en déterminer la proportion à tout instant dans un mélange de lipides par un simple dosage de brome par la technique proposée par deux d'entre nous [6]. Le

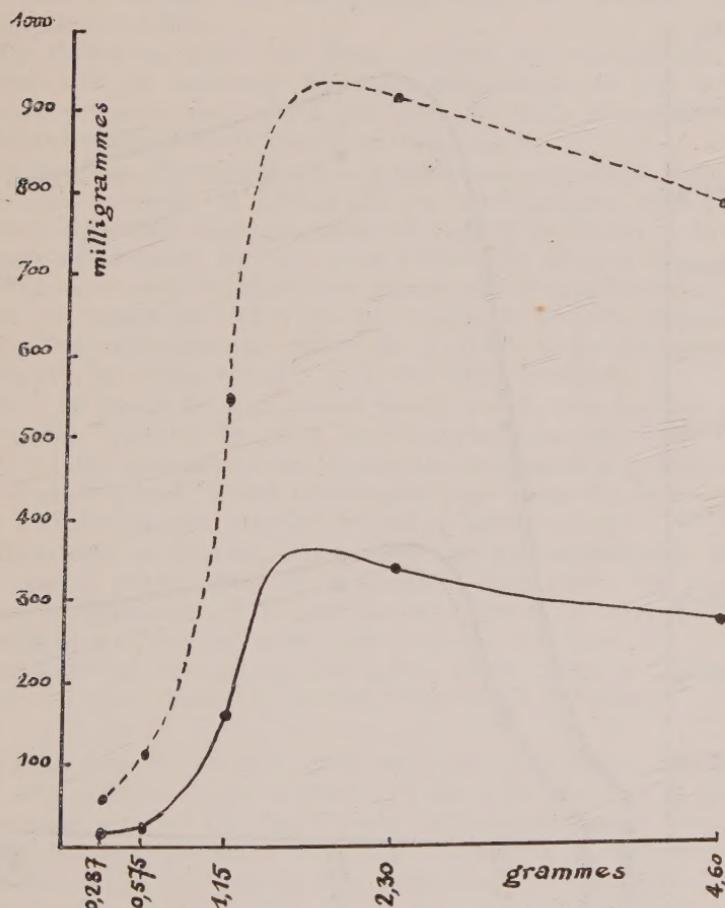


FIG. 2. — En ordonnées : poids de l'extrait éthétré après 5 jours.
En abscisses : quantité de dibromostéarate de potassium.

brome servait en somme d'élément traceur. Nous ne cherchions donc pas à avoir de l'acide dibromostéarique rigoureusement pur. Nous avons simplement débarrassé l'acide bromé de certaines impuretés insolubles dans l'éther de pétrole très froid (-21°C). L'échantillon d'acide bromé qui a servi à nos essais contenait 34,5 p. 100 de brome (chiffre théorique 36,14).

Pour déterminer la masse des substances dissoutes par l'éther, nous évaporons ce solvant, puis le résidu est séché jusqu'à poids constant dans le vide en présence d'anhydride phosphorique. Le résidu sec est dissous dans du chloroforme. La solu-

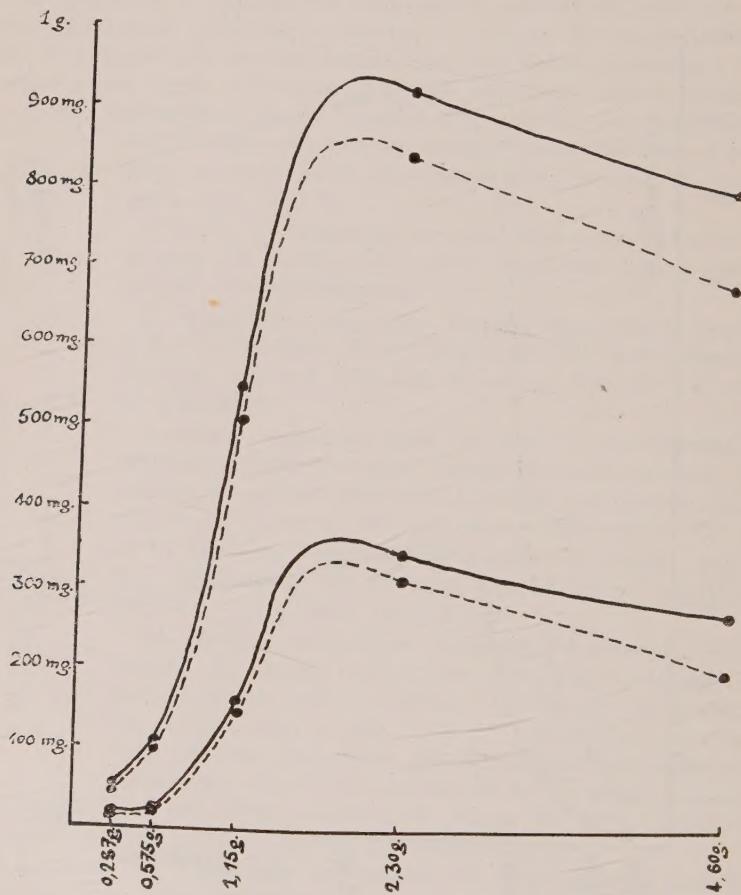


FIG. 3.

tion est filtrée sur verre frité, puis évaporée ; le résidu est pesé après dessiccation sous vide.

La figure 2 comporte deux courbes (1) :

1° Une courbe en trait plein qui correspond au poids des

(1) Les données graphiques sont toutes rapportées à 100 ml de sérum.

substances dissoutes par l'éther après cinq jours de contact dans les tubes en position verticale (cette courbe confirme les conclusions de Macheboeuf et Tayeau).

2° Une courbe en pointillé qui correspond aux poids des substances dissoutes par l'éther après cinq jours, les tubes étant maintenus couchés.

La différence entre les deux courbes est considérable. Le simple fait de maintenir les tubes horizontaux au lieu de les laisser verticaux multiplie à peu près par trois la quantité des substances que dissout l'éther en cinq jours.

Notons dès maintenant que les différences constatées entre les positions verticale et horizontale ne correspondent pas à une simple différence dans la quantité d'acide gras du savon mis en œuvre ayant passé de l'eau dans l'éther. En effet, le dosage du brome dans les extraits éthérés prouve que la proportion d'acide gras provenant du savon est très faible et hors de proportion avec l'accroissement de masse de l'extrait éthéré lorsque l'on compare les tubes couchés avec les tubes verticaux.

Sur la figure 3, nous avons tracé, à côté des courbes déjà présentées dans la figure 2, deux courbes dont les points sont obtenus en retranchant des ordonnées des courbes précédentes, les masses d'acide bromé déterminées par dosage du brome dans les extraits éthérés (courbes en traits interrompus).

Dans cette expérience, nous avions fixé arbitrairement la durée de contact entre l'éther et le sérum à cinq jours. On pouvait donc se demander si le phénomène observé ne découlait pas simplement d'une influence des positions relatives des phases sur la vitesse du passage des lipides d'une phase à l'autre. Il n'en est rien, comme le prouve l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE II. — Deux tubes sont garnis de façon identique : 20 ml de sérum, 20 ml d'éther et 8 ml d'une solution de savon contenant en tout 848 mg d'acide dibromostéarique à l'état de savon. Le mélange savon + sérum avait un pH égal à 9,0 environ. Les deux tubes sont laissés à la température du laboratoire, près l'un de l'autre, mais l'un d'entre eux est placé verticalement, tandis que l'autre est couché. Après un mois, on étudie la phase éthérée de chacun de ces tubes. L'éther du tube couché contient 460 mg de substances lipoidiques, tandis que l'éther du tube vertical n'en contient que 116 mg.

De nombreux essais semblables mettant en œuvre des quantités différentes de savon ont confirmé que les différences entre position couchée et position debout ne sont pas dues à une simple différence dans le temps nécessaire pour atteindre une limite commune. Quelle que soit la durée de contact, la quantité

de lipides qui passe dans l'éther est considérablement plus élevée dans les tubes couchés que dans les tubes maintenus verticaux.

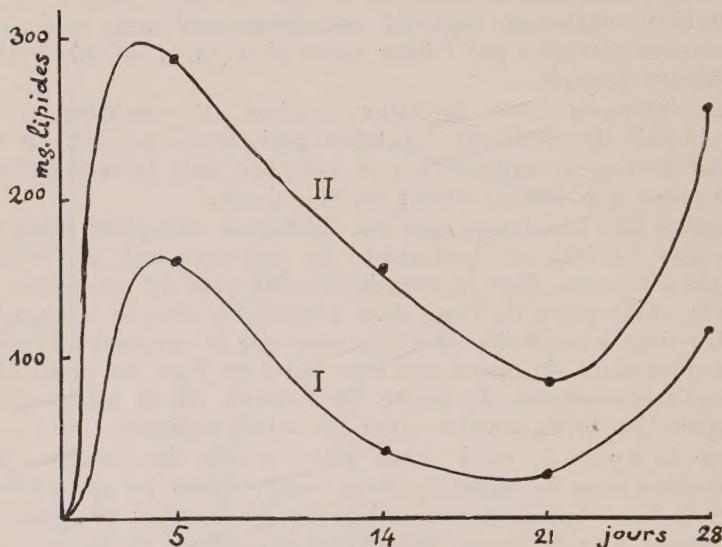


FIG. 4. — Courbe 1: Concentration en savon 1,15 g pour 100 ml de sérum.
Courbe 2 : Concentration en savon 4,6 g pour 100 ml de sérum.

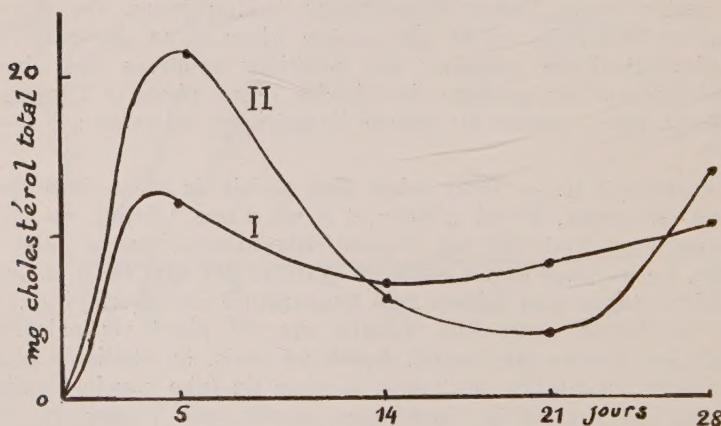


FIG. 5. — Courbe 1: Savon $c = 1,15$ g pour 100 ml de sérum.
Courbe 2 : Savon $c = 4,6$ g pour 100 ml de sérum.

EXPÉRIENCE III. — En poursuivant nos essais sur l'influence de la durée de contact entre l'éther et le sérum, nous avons observé un phénomène très curieux : pendant cinq jours environ,

la quantité de lipides dans la phase éthérée augmente progres-

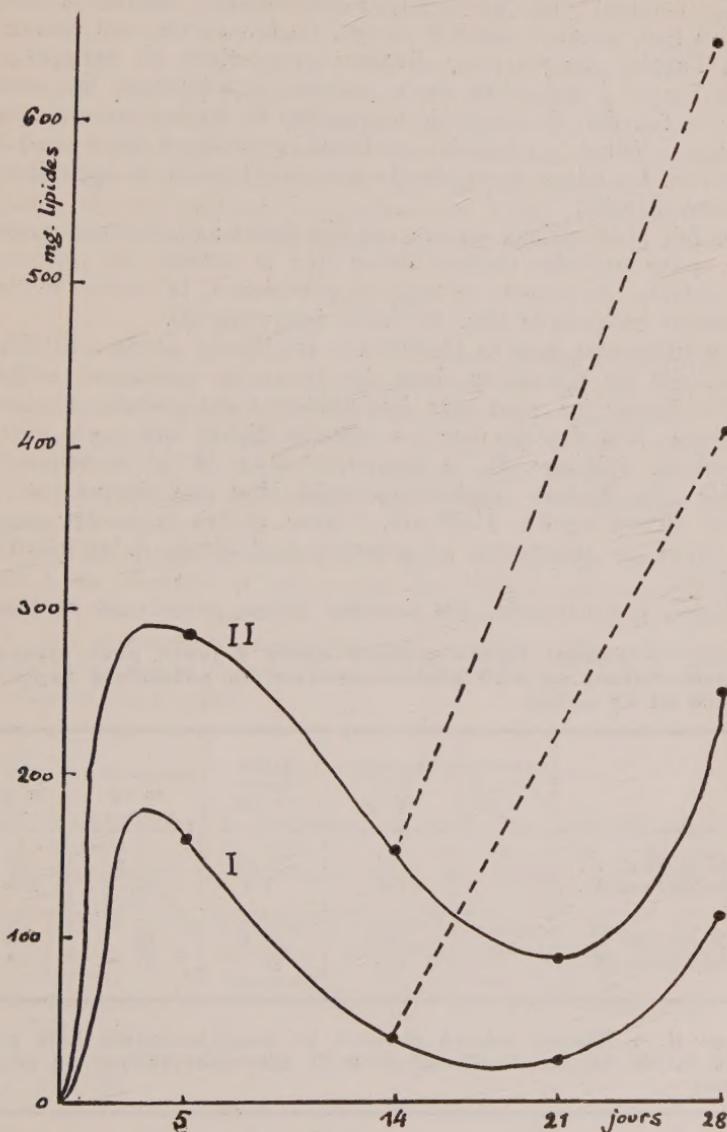


FIG. 6. — Courbe 1 : Savon $c = 1,15$ g pour 100 ml de sérum.
Courbe 2 : Savon $c = 4,6$ g pour 100 ml de sérum.

sivement, puis, contrairement à toute prévision, la quantité de lipides dissoute dans l'éther diminue ensuite nettement. Tout

se passe donc comme si des lipides passaient du sérum dans l'éther pendant cinq jours, puis abandonnaient ensuite la phase éthérée pour repasser dans le sérum. Ce fait curieux est constant, nous l'avons observé pour diverses proportions de savon.

La figure 4 comporte deux courbes représentant les variations en fonction du temps de la quantité de lipides présente dans la phase éthérée, en position verticale, pour deux concentrations en savon. La figure 5 représente les variations de la quantité de cholestérol total.

Un fait plus curieux encore est le suivant : si, au quatorzième jour, pour un tube vertical, alors que la courbe est fortement descendante, on couche le tube en expérience, la courbe devient fortement ascendante (fig. 6) [traits interrompus].

Ces différences dans le décollement des lipides par le 9-10 dibromostéarate de potassium dans des tubes en positions verticale et horizontale ne sont pas imputables à une seule substance lipidique. Nos dosages sur les extraits éthérés ont porté sur le phosphore lipidique [7], le cholestérol total [8] et le brome de l'acide gras [6]. Les résultats montrent bien que chaque fois, et toutes choses égales d'ailleurs, l'éther extrait plus de chacun des types de substances en position horizontale qu'en position verticale.

Voici, par exemple, des données prises parmi nos résultats.

TABLEAU I. — **Extrait éthéré prélevé après 6 jours pour diverses concentrations en 9-10 dibromostéarate de potassium rapporté à 100 ml de sérum.**

	QUANTITÉ de savon en ml	EXTRAIT total en mg	ACIDE bromé en mg	CHOLESTÉROL en mg	P en µg
Tube vertical . . .	5	25	4,8	1,2	55
Tube horizontal . . .		410	7,8	25	254
Tube vertical . . .	20	345	29,2	30	200
Tube horizontal . . .		805	80	94	760

TABLEAU II. — **Extrait éthéré prélevé le vingt-huitième jour pour 100 ml de sérum et 10 ml de 9-10 dibromostéarate de potassium.**

	EXTRAIT TOTAL en mg	ACIDE BROMÉ en mg	CHOLESTÉROL en mg
Tube vertical . . .	176	26,4	14
Tube horizontal . . .	461	312	84,4

En somme, le décollement des lipides du sérum de cheval, par le 9-10 dibromostéarate de potassium, est fonction de plusieurs facteurs dont le plus inattendu est la forme du récipient ou la position de ce dernier. Les différences de passage de lipides constatées dans les tubes verticaux et horizontaux ne proviennent pas d'une différence de vitesse de passage de l'acide gras bromé de l'eau dans l'éther. Il semble que l'épaisseur de la couche de sérum dans le récipient soit le facteur prépondérant.

Nous poursuivons nos recherches sur l'interprétation du processus de décollement des lipides par les savons.

RÉSUMÉ.

Si l'on ajoute un savon à du sérum sanguin en présence d'éther, ce solvant extrait une proportion notable des lipides du sérum. Les modalités de cette extraction sont curieuses :

1^o La quantité d'extrait obtenu pour une teneur donnée en savon dépend de la forme du récipient dans lequel l'éther et le sérum sont laissés en contact (une étude systématique de ce facteur est effectuée).

2^o Si l'on étudie la teneur de l'éther en fonction du temps de contact, on observe qu'une partie des lipides qui passent dans l'éther pendant les premiers jours repasse ensuite dans le sérum.

3^o Les conclusions ci-dessus sont valables pour chacun des divers constituants étudiés dans l'extrait éthétré : phospholipides, cholestérol, acide gras.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. MACHEBOËUF et F. TAYEAU. *C. R. Acad. Sci.*, 1938, **206**, 860.
- [2] M. MACHEBOËUF et F. TAYEAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1181.
- [3] M. MACHEBOËUF et F. TAYEAU. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 31 et 49.
- [4] F. TAYEAU. *Thèse Doctorat ès Sciences*, Bordeaux, 1939.
- [5] F. TAYEAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1027 et 1029.
- [6] A. DESASSIS et M. MACHEBOËUF. *Ces Annales*, 1949, **76**, 6.
- [7] M. MACHEBOËUF et J.-L. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 116.
- [8] M. MACHEBOËUF et J.-L. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 296

LES BACTÉRIES SEMI-RÉSISTANTES AU BACTÉRIOPHAGE

IV. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CERTAINS IONS SUR LE COMPORTEMENT DES BACTÉRIES SEMI-RÉSISTANTES VIS-A-VIS DU PHAGE. SIGNIFICATION DE CES BACTÉRIES.

par R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE.

(Institut Pasteur.)

Influence de la concentration de certains ions.

L'action des ions sur la bactériophagie a été indiquée par Sertic [4] et par Gratia [1]. Dans des publications antérieures [5, 6, 7] nous avons montré que l'interaction du phage S_{13} et des bactéries sensibles était conditionnée par les concentrations des ions PO_4^{4-} et Ca^{++} . Dans un travail en cours nous étudions l'influence analogue d'autres éléments tels que le sodium.

Nous allons voir que l'interaction du même phage et des bactéries semi-résistantes est également conditionnée par les concentrations de ces deux ions, mais avec des exigences différentes en ce qui concerne ces concentrations.

TECHNIQUES. — Les techniques générales ont été décrites dans un mémoire précédent [9]. La seule différence est que, à côté des milieux usuels (eau peptonée et bouillon), divers milieux synthétiques ont été utilisés. Ils ont été établis à partir de l'un des trois milieux de base suivants :

Milieu A. — On prépare les trois solutions suivantes :

1° $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,75 g
KCl	0,5 g
SO_4Mg	0,05 g
Glucose	20 g
Eau bidistillée pour	100 cm ³

2° Solution de $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ à 6 p. 100 dans l'eau bidistillée.

Etant donné que ce sel est hygroscopique, le Ca est titré dans la solution et les quantités de Ca ajoutées au milieu sont calculées d'après ce titrage.

3° Tampon de phosphates de pH 7,6 :

$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}, 12\text{H}_2\text{O}$	19,95 g
PO_4KH_2	0,45 g
Eau bidistillée pour	100 cm ³

Les trois solutions sont autoclavées séparément. On prépare le milieu en ajoutant à 10 cm³ de la première des quantités variables des deux autres et en complétant à 100 cm³ avec de l'eau bidistillée stérile.

Milieu B. — On prépare, en plus des trois solutions précédentes, une solution de α -glycérophosphate de sodium à 23 p. 100.

Après autoclavage, on ajoute à 10 cm³ de la première solution des quantités variables des trois autres et on complète à 100 cm³.

Milieu C.

Lactate d'ammonium à 50 p. 100	42 g
Glycérophosphate de calcium α , quantité variable à partir de.	0,54 g
Sulfate de magnésium	0,12 g
Glucose	15 g
Véronal sodique	3,4 g

Ajouter 500 cm³ d'eau bidistillée, ajuster à pH 7,2 avec HCl N/10 et compléter à 1 l. On ajoute, dans certains cas, des quantités variables de la solution de $\text{CaCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ à 6 p. 100.

Le premier milieu permet d'étudier l'effet des concentrations faibles de Ca^{++} avec des concentrations de PO_4^{4-} assez élevées. Il est tamponné par les phosphates.

Dans le second, on peut introduire, sans qu'elles soient précipitées, de plus grandes quantités de Ca^{++} , en s'arrangeant pour que la quantité de phosphates suffise à obtenir un certain effet tampon (la multiplication du phage S_{13} supporte une certaine acidification, vers pH 5,5). Nous avons vu, dans une publication précédente [6, 7], que le glycérophosphate agit sur la multiplication du phage de la même façon que les phosphates.

Enfin, le dernier milieu permet d'utiliser de très fortes concentrations de Ca^{++} , avec des quantités variables de glycérophosphate. Le tampon véronal-HCl remplace dans ce milieu le tampon de phosphates. On a vérifié que le véronal, à cette concentration, n'inhibe à aucun degré la multiplication des bactéries et des phages.

Dans la seconde des publications citées [7], nous avions déjà montré l'existence d'une différence, au point de vue des exigences en calcium et en phosphates, entre le système phage-souche O et le système phage-souche I (désignée alors sous le nom de souche G. C.). Mais nous avions formulé l'hypothèse que le phage S_{13} subissait une mutation en passant sur cette seconde souche. Cette hypothèse, nous l'avons dit ailleurs [9], n'a pas

été confirmée, et il a été établi que les différences observées étaient dues à des propriétés différentes des deux souches.

Nous rappellerons, en les complétant, les résultats obtenus avec les souches O (sensible) et I (semi-résistante), et nous ensisagerons ensuite le cas de la souche IV (également semi-résistante).

Dans chaque milieu et avec chacune des souches nous avons fait de nombreux essais, avec diverses proportions de phages et de bactéries, et en calculant le rendement en phages ; ce qui a permis de préciser l'influence de la composition du milieu sur la production de phages. Sans entrer dans les détails d'expérience, nous donnerons les résultats essentiels.

Nous dirons d'abord quelques mots des constatations faites dans les milieux usuels ; nous montrerons ensuite comment les recherches ont été orientées par l'analyse de l'eau peptonée utilisée, et enfin comment, en utilisant des milieux synthétiques, on a précisé pour chaque souche les conditions d'équilibre exigées entre les concentrations des deux ions.

I. — CONSTATATIONS FAITES DANS LES MILIEUX USUELS.

En bouillon, on n'obtient la multiplication du phage que sur la souche O, d'ailleurs avec un rendement très variable suivant le lot de bouillon utilisé. Dans les cas où le rendement est faible, on l'améliore par addition d'une petite quantité de CaCl_2 , correspondant à 0,010 g environ de Ca par litre de bouillon.

Sur les souches I et IV, le phage ne se multiplie pas en bouillon, même si on ajoute une faible quantité de CaCl_2 . On n'a pas poussé les investigations plus loin, en particulier on n'a pas essayé d'ajouter une plus grande quantité de CaCl_2 ou des phosphates.

En eau peptonée, on obtient un bon rendement sur la souche O ; l'addition de CaCl_2 (jusqu'à 0,225 g de Ca par litre) ne l'a pas modifié. On n'a pas fait d'autres essais.

Sur la souche I, le rendement est moins bon, mais on l'améliore en ajoutant 0,005 g de Ca par litre. Au contraire, l'addition de phosphates fait baisser le rendement et cela d'autant plus qu'on en ajoute davantage ; à partir de 0,320 g de P ajouté (sous forme de phosphates) par litre de bouillon, le rendement devient nul.

Sur la souche IV, le rendement est très faible en eau peptonée, quelles que soient les proportions de phages et de bactéries ensemencés. L'addition de CaCl_2 augmente ce rendement qui, de 10 passe à 30 par addition de 0,044 g de Ca par litre et à 600 par addition de 0,088 g de Ca par litre.

L'addition de phosphates, même en petite quantité, à l'eau peptonée empêche la multiplication du phage sur la souche IV.

II. — ANALYSE DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX DE L'EAU PEPTONÉE.

Il était évident, d'après les constatations précédentes, que les concentrations en phosphates et en calcium exerçaient une influence sur la multiplication de S_{13} et que cette influence variait avec la souche en cause. Cependant rien ne permettait de refuser un rôle à d'autres éléments du milieu, minéraux ou organiques. L'analyse des cendres de l'eau peptonée a permis d'orienter les recherches.

Une solution de cendres a été préparée de la façon suivante : évaporation à sec d'un certain volume d'eau peptonée, calcination au four à moufle jusqu'aux cendres charbonneuses, suivie d'extraction par l'eau des sels solubles, de calcination du résidu jusqu'aux cendres blanches, et de reprise par l'acide chlorhydrique dilué. La solution chlorhydrique est évaporée à sec et reprise finalement par de l'eau distillée.

Les volumes des liquides d'extraction sont choisis de façon que le volume total des deux liquides réunis soit égal à celui de l'eau peptonée dont ils proviennent.

Par ailleurs, des analyses des éléments minéraux de la peptone (1) ont donné les résultats suivants (les poids en milligrammes sont rapportés à 1 l d'eau peptonée à 3 p. 100).

Na	Très abondant (non dosé).
P	340 (dont 260 de P minéral et 80 de P organique),
Ca	530 (dont 390 de Ca dialysable).
Mg.	25 (dont 12,5 dialysable).
K	{ Traces.
Fe	
Cu	
Mn.	A la limite.
Pb	Extr. limite.

Nous avons obtenu une bonne multiplication du phage sur nos trois souches dans un milieu dont la moitié du volume total était constituée par la solution de cendres et dont la source d'azote était le sulfate d'ammonium et la source de carbone le glucose. Mais, si on constituait le milieu de manière que les cendres soient dissoutes dans un volume égal au volume initial de l'eau peptonée on n'obtenait pas de multiplication sur la souche IV. Or, l'analyse montre que près de la moitié du Ca et le quart environ du P de la peptone sont en combinaison organique ; et que la solution de cendres contient justement deux fois plus de calcium ionisé que le volume correspondant d'eau peptonée.

(1) Ces analyses sont dues à M^{le} Faure (pour le phosphore), à M. Lavollay (pour le calcium et le magnésium), à M. Didier Bertrand (pour l'analyse spectrale qualitative). Nous les en remercions ici.

Il ressortait donc déjà de ces expériences que :

a) Ce sont les éléments minéraux de l'eau peptonée qui interviennent dans la multiplication du phage sur les différentes souches ; b) ils agissent à l'état de composé minéral (et peut-être aussi de sels organiques de faible poids moléculaire, car nos expériences montrent que le P agit aussi bien à l'état de glycérophosphates que de phosphates) ; c) ils doivent être à une certaine concentration.

III. — UTILISATION DES MILIEUX SYNTHÉTIQUES.

Une étude plus précise et plus complète a été faite en utilisant les milieux synthétiques décrits plus haut. Nous en donnerons les résultats les plus significatifs.

Sur la souche O. — Dans une série d'essais avec des milieux du type A, contenant $3,2 \times 10^{-4}$ M de Ca et des concentrations de P (sous forme de phosphates) s'échelonnant entre $2,6 \times 10^{-3}$ M et $7,3 \times 10^{-2}$ M, nous avons constaté que le rendement était maximum pour toutes les concentrations de P comprises entre $2,6 \times 10^{-3}$ M et $1,3 \times 10^{-2}$ M. Entre $1,3 \times 10^{-2}$ M et 4×10^{-2} M de P, le rendement est d'autant plus faible que la concentration du P est plus élevée. Au-dessus de 4×10^{-2} M de P, le rendement est nul. Dans les milieux où la concentration de Ca est supérieure à $3,2 \times 10^{-4}$ M, le rendement varie encore dans le même sens en fonction de la concentration de P ; mais les concentrations de P tolérées sont plus grandes.

Par ailleurs, dans des milieux ayant tous une même concentration de P, choisie convenablement, la multiplication du phage sur la souche n'est observée que si la concentration de Ca est comprise entre un minimum et un maximum ; lesquels diffèrent suivant la concentration en P du milieu.

Sur la souche I, les essais ont été faits dans les milieux de type A ou B. Ces derniers étaient utilisés pour les concentrations de Ca relativement élevées, comme nous l'avons dit plus haut.

La concentration de $3,2 \times 10^{-4}$ M de Ca, qui permettait d'obtenir une bonne multiplication sur la souche O, est ici insuffisante ; si, avec cette concentration de Ca, la concentration de P est inférieure ou égale à $5,4 \times 10^{-3}$ M, le rendement est très faible ; il est nul si cette concentration dépasse $5,4 \times 10^{-3}$ M. Avec des concentrations de $4,8 \times 10^{-4}$ M de Ca, on peut obtenir des rendements plus élevés, mais à condition que la concentration de P ne dépasse pas 7×10^{-3} M ; le rendement est nul dès que la concentration de P atteint 9×10^{-3} M. Dans les milieux où la concentration de Ca dépasse $5,4 \times 10^{-3}$ M, la multiplication du phage est possible mais avec des concentrations plus grandes de P, concentrations qui seraient inhibitrices en présence de moindres

quantités de calcium ; pour une concentration déterminée de P, il faut que la concentration de Ca soit comprise dans une certaine zone au-dessus et au-dessous de laquelle le phage ne se multiplie pas sur cette souche. Les conditions générales sont donc analogues pour les souches O et I, mais pour une même concentration de calcium, l'inhibition par le P commence à partir d'une dose moins élevée ; et pour une même dose de P, la dose de Ca minima nécessaire à la multiplication du phage est plus forte pour la souche I que pour la souche O.

Pour la souche IV, les premiers essais ont été négatifs. Ils étaient faits dans le milieu A avec des concentrations variables de P et de Ca ; mais celles-ci restaient dans l'ordre des valeurs habituellement efficaces pour la multiplication de S_{13} sur les souches O et I. Les résultats de l'analyse de l'eau peptonée et des essais de multiplication de S_{13} sur la souche IV dans l'eau peptonée additionnée de CaCl_2 et de phosphates nous ont amenés à penser que cette multiplication exigeait des concentrations de Ca exceptionnellement élevées. Et en effet, en utilisant le milieu C (qui, comme nous l'avons vu, permet d'atteindre ces fortes concentrations), nous avons obtenu les résultats suivants :

Avec des concentrations de Ca comprises entre $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ et $6,25 \times 10^{-4} \text{ M}$, on n'obtient aucune multiplication du phage sur la souche IV, quelles que soient les concentrations de P (par exemple, $2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$, $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $1,5 \times 10^{-2} \text{ M}$). La concentration de Ca doit être au minimum $2 \times 10^{-3} \text{ M}$; encore faut-il que dans ce cas, la concentration de P soit faible. Si l'on augmente celle-ci, il faut aussi augmenter celle de Ca. Inversement, si l'on augmente fortement (2) la concentration de Ca, sans augmenter celle de P, le rendement baisse, mais pas considérablement. Enfin, une augmentation modérée de la concentration de P sans augmentation de celle du Ca agit beaucoup plus intensément sur le rendement.

Nous n'avons pas fait suffisamment d'expériences pour donner un tableau complet des concentrations optima respectives de Ca et de P (3). Cependant, nous avons constaté qu'on obtenait de bons rendements dans les cas où les concentrations de P et de Ca étaient à peu près équimoléculaires, avec peut-être une concentration de Ca un peu plus élevée que celle du P.

C'est ainsi que nous avons obtenu de bons rendements dans les cas où les concentrations étaient de $2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ de P,

(2) Une augmentation modérée du Ca ne modifie pas le rendement. Par exemple, avec $2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ de P, le rendement ne baisse pas si la concentration de Ca reste entre $2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ et $5,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

(3) Nous reviendrons, d'ailleurs, sur cette question dans un travail ultérieur, car d'autres ions interviennent dans cet équilibre.

$3,9 \times 10^{-3}$ M de Ca et dans ceux où $5,5 \times 10^{-3}$ M de P étaient en présence de $5,7 \times 10^{-3}$ M de Ca ; ou encore $8,4 \times 10^{-3}$ M de P en présence de 1×10^{-2} M de Ca.

DISCUSSION.

On voit que pour une souche donnée, la production des phages S₁₃ n'est possible que si la concentration de Ca ionisé est supérieure à un certain minimum. Cette condition étant réalisée, on remarque que le rendement en phages est maximum tant que la concentration de P utilisable (sous forme d'ions PO₄³⁻ ou à l'état de glycérophosphate) est inférieure à une certaine valeur critique ; si elle dépasse cette valeur, le rendement diminue en fonction de l'augmentation du taux de P (zone d'inhibition partielle par les phosphates), et devient nul à partir du moment où celui-ci atteint une seconde valeur critique (zone d'inhibition totale par les phosphates).

Si, toujours avec la même souche, on emploie une concentration de Ca plus forte, on constate que les deux concentrations critiques de P sont plus élevées, autrement dit que la tolérance du système phage-bactérien pour les phosphates augmente, en fonction de la concentration du Ca. Mais ceci ne vaut que dans de certaines limites, car des concentrations trop élevées aussi bien de P que de Ca sont incompatibles avec la multiplication du phage.

L'interaction du phage S₁₃ et des bactéries d'une souche donnée n'a donc lieu que si les conditions suivantes sont réalisées : a) une concentration de Ca supérieure à un minimum ; b) une concentration de P inférieure à un maximum ; c) dans la zone où les concentrations de Ca et de P sont compatibles avec cette interaction, un rapport des concentrations moléculaires Ca/P compris entre certaines limites.

Il importe ici de souligner que ces exigences se chiffrent différemment pour chaque souche. Des trois souches étudiées, c'est la souche IV qui exige le plus de Ca et tolère le moins de P ; puis vient la souche I, qui exige moins de Ca que la précédente et tolère davantage de P et enfin la souche O, qui, des trois, exige le moins de Ca et tolère le plus de P. Les 3 souches s'échelonnent dans le même ordre, si on les considère au point de la valeur optima du rapport Ca/P. Cette valeur est aux environs de 1 pour la souche IV, de 7×10^{-2} pour la souche I et de $2,4 \times 10^{-2}$ pour la souche O.

Les expériences relatées ci-dessus montrent donc que le rendement en phages dépend de l'équilibre ionique du milieu.

Or, nous avons vu dans un mémoire précédent [10] que si l'on considère des cultures en eau peptonée, chaque souche est caractérisée par un certain pourcentage de bactéries réceptives au

phage et qu'une souche produit d'autant plus de phages que ce pourcentage est plus élevé.

L'équilibre ionique du milieu agit donc très probablement sur le rendement en phages par l'intermédiaire d'une modification du pourcentage des bactéries réceptives.

Dans le cas d'une souche semi-résistante en M. S., si l'on fait varier à l'intérieur d'une certaine zone les concentrations des ions P et Ca, le rendement est fonction des variations de l'équilibre entre ces ions. Par ailleurs, il existe une zone de concentrations où le rendement est nul, et une zone où il est maximum.

Dans la zone où le rendement est nul, toutes les bactéries seraient en état réfractaire, dans celle où il est maximum elles seraient en majorité en état réceptif. Dans la zone intermédiaire, les unes seraient en état réceptif, les autres en état réfractaire. Si, tout en restant dans cette zone intermédiaire, on change les concentrations des ions, on changerait les proportions des deux variétés. Par exemple, en modifiant la concentration des phosphates dans un certain sens, on ferait passer une partie des bactéries de l'état réfractaire à l'état réceptif.

Dans le cas de la souche sensible O, cultivée dans l'eau peptonée que nous utilisons, toutes les bactéries sont réceptives à l'infection par le phage. Mais la production de phages est aussi influencée par l'équilibre ionique du milieu. L'analogie est évidente avec les souches semi-résistantes et, en effet, nous avons vu [7] qu'une telle modification est due à ce qu'un certain nombre de bactéries deviennent incapables de multiplier le phage.

Signification des bactéries semi-résistantes.

Il nous reste à essayer de préciser, à l'aide des résultats acquis dans cette série de recherches, la signification des bactéries semi-résistantes ; d'une part, en comparant leurs réactions aux différents types de réactions aux phages déjà connues, d'autre part, en les étudiant au point de vue génétique. Enfin, nous dirons quelques mots de ce qu'on pourrait appeler la réceptivité d'une population bactérienne vis-à-vis du phage.

1^o LES DIFFÉRENTS TYPES DE RÉACTIONS DES BACTÉRIES AUX PHAGES.
— Il importe de préciser en quoi les réactions des bactéries semi-résistantes aux phages diffèrent de celles des bactéries résistantes, des bactéries sensibles et des bactéries lysogènes.

a) Les bactéries résistantes se comportent dans une certaine mesure comme les bactéries semi-résistantes en état réfractaire. Mais leur résistance au phage est permanente et définitive.

b) Les bactéries sensibles réagissent comme des bactéries semi-résistantes en état réceptif, et l'analogie se poursuit en

ce sens qu'elles exigent certaines conditions d'équilibre ionique du milieu pour produire du phage. Mais, d'une part, ces conditions sont beaucoup moins étroites, d'autre part, les populations de bactéries sensibles sont homogènes dans leurs réactions au phage (en dehors de mutations possibles), alors que des bactéries semi-résistantes d'une même population sont les unes en état réfractaire, les autres en état réceptif avec passage possible de l'un à l'autre.

c) Les bactéries lysogènes, enfin, ressemblent aux bactéries semi-résistantes par le point suivant : à un instant donné, certaines sont réfractaires au phage qu'elles portent, alors que d'autres sont en état d'être lysées par lui. Mais il s'agit d'une différence de comportement uniquement *envers le phage porté par les bactéries*, alors que la semi-résistance se manifeste pour un phage venu du dehors, dès la première infection par celui-ci. En effet, l'apparition de mutants semi-résistants a été constatée dans des souches sensibles qui n'ont jamais été en contact avec le phage.

Notons que, étant donné qu'il existe des souches cryptolysogènes, nous avons essayé par tous les moyens de mettre en évidence une infection latente par un phage dans les populations semi-résistantes ; toutes ces tentatives ont échoué. Mais, répétons-le, même si ces souches étaient lysogènes, cela n'expliquerait pas leur comportement particulier envers une infection par un phage venu du dehors.

2^o PROBLÈMES GÉNÉTIQUES. — Par ailleurs, les bactéries semi-résistantes posent des problèmes *d'ordre génétique*.

Luria et Delbrück [3] ont démontré que chacune des colonies de la culture secondaire de la souche de *E. coli* T après la lyse par le phage T₂ a pour origine un mutant et n'est pas composée de bactéries modifiées par le phage.

Nous avons vu que la souche O de Y6R donne deux sortes de colonies secondaires, les unes résistantes, les autres semi-résistantes au phage S₁₃. Nous avons constaté que les bactéries semi-résistantes apparaissent également dans cette souche en dehors de la présence du phage. Il est donc évident qu'elles proviennent aussi d'une mutation. La mutation est caractérisée, entre autres, par une modification des exigences, au point de vue de l'équilibre Ca — P, de l'appareil enzymatique qui fait la synthèse du phage.

Les deux modes de passage de l'état réfractaire à l'état réceptif ou inversement ont une signification bien différente l'une de l'autre au point de vue génétique.

1^o Quand on fait changer l'état des bactéries en modifiant l'équilibre ionique du système, on ne modifie pas génétiquement

ces bactéries qui gardent les mêmes exigences au point de vue de cet équilibre. On utilise seulement leur propriété de réagir différemment suivant les milieux.

2° Quand, sans qu'il y ait une modification de l'équilibre ionique qui puisse en rendre compte, des bactéries réceptives apparaissent en présence de phages dans la descendance des bactéries réfractaires, celles-ci appartiennent à un autre génotype que les premières puisqu'elles n'ont pas les mêmes exigences au point de vue de l'équilibre ionique. On peut donc interpréter ce second phénomène comme une mutation, peut-être provoquée par l'action de produits du métabolisme du système phage-bactérie. Il paraît donc comparable à celui que nous avons décrit sous le nom de lyse par entraînement [8]. En effet, dans ce dernier on voit apparaître, sous l'influence d'un facteur produit par le métabolisme phage-bactérie, des bactéries sensibles dans la descendance de bactéries résistantes.

3° RÉACTIVITÉ D'UNE SOUCHE BACTÉRIENNE VIS-A-VIS D'UN PHAGE.
— Il ressort des faits que nous avons constatés que les souches bactériennes d'une même espèce (sensibles ou semi-résistantes) peuvent présenter, vis-à-vis d'un même phage, des réactions différentes.

Dans le but de comparer entre elles ces réactions, nous proposons d'introduire la notion de *réactivité d'une souche vis-à-vis d'un phage*.

On peut avoir une notion du degré de réactivité de diverses souches semi-résistantes en les comparant à celles d'une souche sensible de même espèce prise pour étalon.

Cette réactivité sera d'autant plus grande que (toutes choses égales d'ailleurs) les plages seront plus grandes et plus nombreuses et le rendement en phages plus élevé, pour une culture infectée.

Le pourcentage des bactéries réceptives de la souche pourrait donner une mesure de cette réactivité. Celle de la souche sensible, dont toutes les bactéries sont capables au même moment de faire la synthèse du phage, serait égale à l'unité.

Rappelons que d'Hérelle [2] avait admis l'existence de phages de *virulence différente* : les phages les plus virulents produiraient pour cet auteur des plages plus nombreuses et plus grandes, ainsi qu'une lyse totale en milieu liquide, même avec une préparation de phages peu concentrée. Cette notion de virulence n'a jamais été bien précisée, mais on est fondé à se demander, en examinant les observations de cet auteur, si les différences apparentes qu'il avait observées dans l'activité des phages n'étaient pas dues en réalité à ce qu'il les faisait agir sur des souches de *réactivité* différente.

D'ailleurs les travaux plus récents n'ont apporté aucun fait qui confirmât l'existence de différences dans la « virulence » des phages.

Il nous semble donc que la notion de réactivité des souches loîve remplacer celle de virulence des phages.

Conclusions.

1^o La production des phages par la souche sensible aussi bien que par les souches semi-résistantes varie en fonction des concentrations des ions Ca⁺⁺ et PO₄⁴⁻ dans le milieu. Plus précisément, la production des phages n'est possible que pour des concentrations de Ca⁺⁺ comprises entre un minimum et un maximum, et pour des concentrations de P inférieures à un maximum, avec en plus des valeurs déterminées du rapport des concentrations de ces deux éléments. Il faut souligner que les conditions d'équilibre ainsi définies sont différentes pour chaque souche.

Il semble que, pour chaque souche semi-résistante, on fasse passer certaines bactéries de l'état réfractaire à l'état réceptif, ou inversement, sous l'influence des modifications qu'on apporte aux concentrations des deux ions.

2^o Les bactéries semi-résistantes se caractérisent par des réactions aux phages différentes de celles des bactéries résistantes, des bactéries sensibles et des bactéries lysogènes.

3^o Les bactéries semi-résistantes, dans les cas étudiés, proviennent par mutation des bactéries sensibles.

4^o En présence du phage, elles peuvent passer de l'état réfractaire à l'état réceptif, probablement aussi par mutation.

5^o La notion de réactivité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un phage a été définie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 443.
- [2] F. d'HÉRELLE. *Le Bactériophage et son comportement*. Masson, 1926, p. 60.
- [3] S. LURIA et M. DELBRUCK. *Genetics*, 1943, **28**, 491.
- [4] V. SERTIC. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 98.
- [5] R. WAHL. *Ces Annales*, 1946, **72**, 73.
- [6] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 137.
- [7] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE. *Ces Annales*, 1951, **80**, 155.
- [8] R. WAHL et J. JOSSE-GOICHOT. *Ces Annales*, 1949, **76**, 43.
- [9] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 28.
- [10] R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 44.

DE LA VALEUR DES CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES BRUCELLA

par G. RENOUX et L. CARRÈRE (*)

(avec la collaboration technique de H. QUATREFAGES)

(Centre OMS/FAO de Recherches sur la Fièvre Ondulante,
Montpellier.)

Les méthodes qui permettent de différencier l'un de l'autre les trois types — *melitensis*, *abortus* ou *suis* — les plus communs des *Brucella* ont été établies par Huddleson [1, 2] : journallement employées dans les laboratoires spécialisés dans l'étude des *Brucella*, elles sont la base de nos connaissances sur les subdivisions de ce genre (voir, par exemple, Taylor, Lisbonne et Roman [3]), un moment unifié (A. Evans [4]).

Ces techniques utilisent, rappelons-le, le besoin en CO₂ pour le développement des cultures, la production d'anhydride sulphydrylique et l'inhibition différentielle par certains colorants ; elles peuvent être complétées par les résultats de la culture sur milieu à l'œuf de Petragnani [5, 6] et par la mesure semi-quantitative de l'activité uréasique des *Brucella* [7, 8]. A quoi s'ajoute l'identification sérologique par des sérum monospécifiques préparés par adsorption différentielle, question sur laquelle nous espérons bien revenir un jour.

L'importance à la fois pratique et doctrinale du problème nous a incités à rechercher jusqu'à quel point les caractères « huddlesoniens » des *Brucella* sont fixes, s'il n'y a pas d'artifices expérimentaux simples capables de les faire varier, en bref, si les caractéristiques d'une souche donnée ont une constance telle qu'on puisse considérer comme valable l'interprétation usuelle des résultats obtenus quand on différencie une souche récemment isolée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches utilisées sont soit des souches du C. R. F. O., soit des souches reçues de l'étranger. Toutes sont conservées avec

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 octobre 1951.

l'ensemble des précautions nécessaires pour éviter une variation spontanée. Dans chaque essai, les témoins « souche initiale » sont identifiés à nouveau avec le même milieu de culture, les mêmes colorants et dans la même série que les cultures en expérience qui sont encadrées par l'identification de souches de références connues.

Le milieu de culture est le Bacto-tryptose agar (Difco) d'un lot vérifié valable [9] à pH 6,9, coulé en boîtes de Petri ; les colorants, toujours les mêmes, proviennent de la « National Aniline Co ».

Dans les cas typiques les résultats des épreuves de Huddleson sont les suivants :

TABLEAU I.

	BESOIN en CO ₂	THIONINE 1/30 000		FUCHSINE 1/25 000		SH ₂			
		48 h.	72 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.
		—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Brucella melitensis</i>	—	+++	+++	+++	+++	ou —	—	—	—
<i>Br. abortus</i>	+	—	—	+++	+++	++	++	—	—
<i>Br. suis</i>	—	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	++

Chaque identification est faite en double exemplaire, l'un d'eux étant porté en atmosphère enrichie de 10 p. 100 de CO₂. Dans les lignes qui suivent, nous ne signalerons pas le besoin en anhydride carbonique ; sauf de rares exceptions, les souches de *Br. abortus* se développent aussi bien à l'air libre qu'en présence de CO₂ au bout d'un certain nombre de repiquages.

Bien entendu, en même temps que la culture sur Bacto-tryptose-agar additionné de colorants, nous pratiquons une culture témoin,ensemencée et incubée dans les mêmes conditions sur ce milieu seul, dépourvu de tout bactériostatique.

La culture sur milieu de Petragnani a été faite et examinée selon les recommandations de Lisbonne et Roman [6].

Nos expériences sont de trois types :

1° Différencier les *Brucella* issues de colonies apparues malgré la présence de colorants bactériostatiques, fuchsine basique ou thionine, dans les milieux de culture ;

2° Différencier les *Brucella* qui ont cultivé sur le milieu de Petragnani, quand il s'agit de souches de *Br. abortus* ou *suis* qui, en principe, ne devraient pas se développer sur un tel milieu ;

3° Suivre le sort d'une souche de *Brucella* après son passage par des organismes animaux.

RÉSULTATS

I. — IDENTIFICATION DES COLONIES APPARUES SUR LES MILIEUX ADDITIONNÉS DE COLORANTS. — Cette expérience a porté sur neuf souches :

- 1 *Br. melitensis* typique (H 466) ;
- 4 *Br. abortus* typiques (H 470, H 672, B 55, H 840) ;
- 1 *Br. suis* typique (S 3) ;
- 3 Souches atypiques (1) (H 512, H 839, B 117).

Elle est résumée dans le tableau II où, pour chaque souche étudiée, la première ligne indique les caractères de Huddleson

TABLEAU II. — Caractères « huddlesoniens » de colonies prélevées sur milieux additionnés de colorants.

	THIONINE		FUCHSINE		SH ₂				
	48 h.	72 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	
	—	—	—	—	—	—	—	—	
H 466.	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	Mel. Ab. atypique.
Fuchs.	—	—	+++	+++	—	—	—	—	
H 470.	—	—	+++	+++	++	++	—	—	Ab. Mel.?
Thion. (1) . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	
H 672.	—	—	+++	+++	+++	++	—	—	Ab. Mel.
Thion. (1) . . .	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	
B 55.	—	—	+++	+++	+++	+	—	—	Ab. Mel.
Fuchs.	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	
H 840.	—	—	+++	+++	+++	++	+	—	Ab. Ab.
Fuchs.	—	—	+++	+++	+++	++	+	—	
S 3.	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	+	Suis. Atypique.
Fuchs.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
H 512.	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	Atypique (ab.?).
Thion.	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	Atypique (ab.?).
Fuchs.	—	—	+++	+++	+++	+++	++	—	Abortus.
H 839.	—	+	+++	+++	—	—	—	—	Mel. atypique? Mel.
Fuchs.	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	
B 117.	—	+	+++	+++	+++	+++	+++	—	Ab. atypique. Atypique. Mel.?
Thion.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Fuchs.	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	

(1) Isolement et identification de colonies rares et petites qui ont cultivé après le troisième jour d'incubation. H, origine humaine; B, origine bovine; S, origine suine.

(1) Classées *melitensis* et *abortus* atypique d'après leur origine animale et géographique.

de la souche originelle, la ou les lignes suivantes montrent les caractères d'identification des souches dérivées de colonies prélevées sur les boîtes additionnées de colorants.

Dans un cas, celui de H 840, les caractères de la souche « fuchsine » sont les mêmes que ceux de la souche originelle ; dans les 8 autres essais on peut constater des modifications plus ou moins importantes :

a) Colonies prélevées sur Bacto-tryptose agar additionné de fuchsine basique (concentration de colorant 1 : 25 000) :

— la souche H 466, *melitensis* typique, fournit des colonies « fuchsine » à caractères de *Br. abortus* atypique ;

— la souche B 55 est *Br. abortus* typique, tandis que ses colonies « fuchsine » ont les caractères de *Br. melitensis* typique ;

— les colonies fuchsine (voir la note au bas du tableau II) de *Br. suis* S 3 deviennent inclassables, tous les caractères étant positifs ;

— H 839 est classé *Br. melitensis* atypique — à cause de son développement déficient sur milieu à la thionine : ses colonies fuchsine ont les caractères de *Br. melitensis* typique ;

— deux souches considérées *Br. abortus* atypique (croissance sur le milieu à la thionine) donnent naissance à des colonies « fuchsine » à caractéristiques opposées : les unes, issues de H 512 (isolée d'un cas humain), sont *Br. abortus* typique, mais celles dérivées de B 117 (d'origine bovine) sont *Br. melitensis*.

b) Colonies prélevées sur Bacto-tryptose agar contenant 1 : 30 000 de thionine :

— deux souches de *Br. abortus*, H 470 et H 672 (voir la note au bas du tableau II), ont des colonies-filles « thionine » qui sont *Br. melitensis* typique ;

— H 512, *Br. abortus* atypique, dont les colonies « fuchsine » sont typiquement *Br. abortus*, conserve ses caractères atypiques dans sa descendance « thionine » ;

— enfin la souche B 117, *Br. abortus* atypique, dont les colonies « fuchsine », nous venons de le voir, peuvent être classées *Br. melitensis*, donne des colonies « thionine » inclassables, puisque tous les caractères sont positifs.

II. — IDENTIFICATION DES COLONIES APPARUES SUR MILIEU DE PETRAGNANI. — *Brucella melitensis* seul serait capable de cultiver sur milieu de Petragnani [5, 6] ; il arrive cependant qu'un certain nombre de souches de *Br. abortus* ou *suis*, typiques d'ailleurs, présentent après culture sur ce milieu des colonies plus ou moins abondantes [6] après huit à dix jours d'incubation à 37°.

Telles sont les cultures qui ont servi à la présente expérience qui porte sur 12 souches (tableau III) :

TABLEAU III. — Identification des colonies qui ont cultivé sur milieu de Petagnani.

	THIONINE		FUCHSINE		SH ₂					
	48 h.	72 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	
1 020 . . .	—	—	+++	+++	+++	++	+	±		Ab.
Petra. . .	—	—	+++	+++	+++	+++	++	++	+	Ab.?
1 021 . . .	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	++		Ab.?
Petra. . .	—	—	+++	+++	+++	+++	++	++		Ab.?
99 D 3 . . .	—	—	+++	+++	+++	+++	+	—	—	Ab.
Petra. . .	+	++	+++	+++	+++	—	—	—		Mel.
50/609 . . .	—	—	+++	+++	+++	++	+	+	—	Ab.
Petra. . .	++	++	+++	+++	—	—	—	—	—	Mel.
S 1	++	++	—	—	+++	+++	+++	++	+++	Suis.
Petra. . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	Atypique.
S 3	++	+++	—	—	+++	+++	+++	+		Suis.
Petra. . .	+++	+++	+++	+++	—	—	±	+	—	Mel.?
S 3 LXII . . .	++	+++	—	—	+++	+++	+++	++		Suis.
Petra. . .	+++	+++	++	+++	—	—	—	+	+	Mel.?
S 6 1942 . . .	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	++		Suis.
Petra. . .	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	++		Suis.
S 6 Toul. . . .	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	++	+++	Suis.
Petra. . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Atypique.
P 2	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	Suis.
Petra. . .	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	Suis.
B 117	—	+	+++	+++	+++	+++	++	—	—	Ab. atypique?
Petra. . .	—	++	+++	+++	+++	++	—	—	—	Ab. atypique.
50/429 . . .	+	+	+++	+++	+++	++	++	+	+++	Ab atypique.
Petra. . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Atypique.

4 *Br. abortus* typiques : 1020, 1021, 90 D3, 50/609 ;

6 *Br. suis* typiques : S 1, S 3, S 3 LXII, S 6 1942, S 6 Toul., P. 2 ;

2 *Brucella* atypiques : B 117 et 50/429.

Dans 5 essais, les colonies « Petagnani » ont les caractères de la souche d'origine : 4 *Brucella* typiques (1020, 1021, S 6 1942 et P2) et 1 *Br.* atypique (B 117) ; remarquons que les colonies « Petagnani » de cette dernière souche n'ont pas le même comportement que ses colonies éventuellement développées sur milieu contenant thionine ou fuchsine basique.

Dans les 7 autres cas, les colonies « Petagnani » ont des caractères de Huddleson qui ne sont pas ceux de la souche d'ori-

gine : S 1 et S 6 Toul., *Br. suis* typiques, ont fourni des colonies-filles inclassables — tous les caractères positifs : la souche 50/429 (*Br. atypique*) se range dans la même catégorie ;

— les colonies « *Petragnani* » de S 3 LXII pourraient être classées « *Br. melitensis* » s'il n'y avait pas cette curieuse production d'hydrogène sulfuré à partir du quatrième jour ;

— les trois souches qui restent, 50/609 (*Br. abortus* typique d'origine israélienne), S 3 (*Br. suis* typique isolé aux Etats-Unis) et 99 D3 (*Br. abortus* typique venant de la Grande-Bretagne) ont donné tardivement des colonies sur milieu de *Petragnani* : ces colonies ont les caractères de Huddleson de *Br. melitensis* typique. On peut remarquer, ici aussi, que les colonies *Petragnani* de la souche S 3 n'ont pas les mêmes caractères que les colonies thionine dérivées de la même souche.

III. — IDENTIFICATION DE SOUCHES ISOLÉES APRÈS PASSAGE PAR L'ANIMAL. — La souche utilisée est un variant spontanément apparu de la souche de *Br. abortus* B 112. Ce variant est devenu atypique, puisqu'il cultive sur milieu à la thionine. Il s'est conservé tel depuis.

Cette souche a été injectée sous la peau de 8 moutons neufs, vérifiés indemnes de Brucellose, puis « récupérés » à deux reprises par hémocultures pratiquées quinze et vingt jours après l'inoculation ; en même temps, 9 cobayes, vérifiés indemnes de Brucellose, eux aussi, subissaient la même inoculation : nous pouvions obtenir la souche par culture du sang quinze jours après l'infection.

TABLEAU IV. — Identification des souches isolées d'ovins et de cobayes après injection à ces animaux d'une souche atypique de *Brucella*.

	THIONINE		FUCHSINE		SH ₂				
	48 h.	72 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	
B 112.	—	—	—	—	—	—	—	—	
Variant original . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—	<i>Ab. atypique</i>
Passé par 8 moutons :									
1 ^{re} hémoculture :	+++	+++	+++	+++	++	+	—	--	<i>Mel. atypique?</i>
2 ^e hémoculture :	+++	+++	+++	+++	++	+	--	--	<i>Mel. atypique?</i>
Passé par cobayes :									
5/9	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	<i>Mel. atypique?</i>
4/9	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	<i>Mel.</i>

Cette expérience montre — les identifications des souches isolées par hémoculture étant faites en même temps et sous les mêmes conditions que de nouvelles identifications de la souche originale — que le passage par les ovins et par 5/9 des cobayes a nettement atténué l'aptitude à produire de l'hydrogène sulfuré : donc tendance à l'apparition de caractères *melitensis* ; ces caractères *melitensis* sont complets pour les cultures isolées de 4/9 cobayes.

DISCUSSION ET COMMENTAIRES.

L'étude expérimentale de la variabilité (2) des caractères de Huddleson n'a pas beaucoup retenu l'attention des chercheurs. A notre connaissance, seuls Lisbonne et coll. [10], par le moyen de la parabiose en tubes d'Asheshof ont vu qu'il était possible de modifier les *Brucella* : une souche de *Br. suis* acquiert l'aptitude à dégager SH₂ ; dans les mêmes conditions, une souche de *Br. abortus* mise en parabiose avec *Br. melitensis* pousse sur thionine et ne dégage plus d'hydrogène sulfuré : elle est devenue *Br. melitensis*. Ces auteurs se bornent à constater le fait, tout en insistant sur la remarquable fixité des caractères de Huddleson dans la nature.

Dans les essais que nous relatons ici, il ne s'agit nulle part de l'étude de souches artificiellement fabriquées sous l'influence de phénomènes d'induction au sens le plus large du mot : expériences qui, étant donné la grande adaptabilité des bactéries en général à des conditions nouvelles, ne doivent pas manquer de donner des résultats tels que ceux que mentionnent Lisbonne et coll. ; il serait bien étonnant que les *Brucella* soient une exception à peu près unique à la grande loi de plasticité biologique des Prokaryotes.

Nous pensons avoir éliminé une partie des facteurs accessoires qui faciliteraient, par une sorte d'entraînement (2), l'apparition de souches modifiées en nous bornant à recueillir soit les colonies développées normalement sur Bacto-tryptoseagar + un colorant, soit celles apparues tardivement sur un milieu en principe inhibiteur pour la variété considérée, soit enfin les cultures obtenues de l'ensemencement du sang d'animaux (moutons et cobayes) infectés par une souche choisie.

Dans ces conditions nous constatons :

Toutes les souches de *Brucella* étudiées ne sont pas aptes à fournir des colonies-filles qui soient différentes de la souche

(2) Nous employons ce terme dans son acception la plus vague sans qu'il entre dans notre intention, du fait de cette utilisation, la moindre tentative d'explication des faits observés.

originelle : cela n'a été possible que dans 15 expériences sur 21 tentées ;

L'apparition de colonies « colorants » à caractères autres que ceux de la souche-mère ne semble pas dépendre des caractères atypiques de la culture choisie : nous avons utilisé 16 souches atypiques, représentant 16 expériences et 4 souches atypiques représentant 5 expériences ; dans le premier groupe, 11 échantillons ont donné des colonies d'un type nouveau contre 4 dans le deuxième groupe : la proportion des « variants » est exactement la même (11/16) dans le groupe des souches originellement typiques que dans le deuxième groupe (4/6), sans que ce nombre réduit permette une conclusion formelle ;

Les colonies « thionine », quand elles sont issues du repiquage d'éléments tardivement apparus sur le milieu additionné de ce colorant, ont toutes des caractères qui les rapprocheraient de *Br. melitensis*, quels que soient l'origine et les caractères de la souche-mère ;

Les colonies « fuchsine » dérivées de souches qui ont les mêmes caractères (cas de H 512, H 839, B 117) sont classables tantôt *Br. melitensis*, tantôt *abortus* ;

Les colonies « Petagnani » qui sont différentes de la souche-mère sont de deux types : l'un — 3/7 cas — inclassable, car tous les caractères sont positifs, l'autre — 4/7 cas — *Br. melitensis* ;

Pour une souche donnée, les cultures-filles « colorants » n'ont pas les mêmes caractères de Huddleson : tels sont les cas de H 512 et de B 117 dont les colonies « thionine » sont inclassables, les colonies « fuchsine » *Br. melitensis* dans un cas, *Br. abortus* dans l'autre, les colonies « Petagnani » de B 117 ayant conservé les caractères de la souche-mère.

Rien, dans ces constatations, ne permet de penser que le colorant présent dans le milieu de culture joue un rôle dans la création des caractères nouveaux.

Le passage à travers ovins ou cobayes d'un « variant » spontané d'une souche de *Br. abortus* (isolée d'une vache) a abouti à la transformation en *Br. melitensis*. Cette expérience reproduit un essai déjà ancien de Wilson et Evans [41] qui avaient réussi à modifier en *Br. abortus* une souche de *Br. melitensis* injectée à une vache pleine, sans pouvoir renouveler ce résultat dans d'autres tentatives. Le succès que nous avons obtenu, dans des conditions (animaux soigneusement examinés, isolés loin de tout contact, etc.) qui permettent d'éliminer toute cause de contamination par un autre virus, tient sans doute à une plasticité toute particulière de la souche employée. Les cas où *Br. melitensis* a pu être isolé de vaches naturellement contaminées sont très nombreux : cet animal — ce substrat — n'est peut-être pas

assez sélectif et il n'est pas impossible d'admettre que d'une manière, mettons exceptionnelle, *Brucella* puisse évoluer dans le sens *melitensis* à travers d'autres organismes animaux. L'infection des ovins ou des caprins par *Br. abortus* n'est-elle pas une rareté ?

Dans toutes ces expériences, tout semble se passer comme si les souches examinées, qu'elles soient au départ typiques ou non, étaient composées non pas d'un type unique de bactéries, mais d'un mélange de divers types que le prélèvement sur tel ou tel substrat révélerait et permettrait de mettre facilement en évidence.

La plasticité individuelle des cellules brucellennes nous semble insuffisante pour expliquer tous ces faits, plus facilement compréhensibles si l'on veut bien admettre à l'intérieur même de la population complète de la souche, la présence de groupements plus ou moins importants à caractères tranchés.

Les caractéristiques de cette souche, telles qu'elles nous apparaissent à travers le filtre de la technique, seront une composante : elles résulteront de la somme algébrique des caractères réels, immédiats ou potentiels des individus qui la constituent (3).

Selon la souche, l'identification révélerait :

Un groupe prédominant massivement et ce sera une souche dite « typique » ;

Deux ou plusieurs groupes et ce sera une souche dite « atypique ».

Il faut remarquer que les caractères d'identification des *Brucella*, tels qu'ils sont établis, reposent tous sur des différences quantitatives et non qualitatives :

- toutes les *Brucella* fermentent le glucose [12] ;
- toutes les *Brucella* — pathogènes — ont une catalase [13] ;
- toutes les *Brucella* donnent un dégagement plus ou moins important d'hydrogène sulfuré [1, 2, 3] ;
- toutes les *Brucella* possèdent une uréase [7, 8] ;
- toutes les *Brucella* ont la même composition antigénique,
- seules les proportions relatives des antigènes sont variables [14].

La séparation en espèces tranchées des *Brucella*, sur le plan scientifique, serait à peu près le seul exemple connu dans la clas-

(3) Au moment de remettre ce manuscrit à l'impression, nous prenions connaissance d'un travail (MM. M. MALFATTI et D. ITHURRALDE, Valor taxonomico de las Imagines Electronicas de las Bacterias del Genero *Brucella*, *La Semana Medica*, 1951, n° 2991) dont les images — 9 publiées sur 63 souches étudiées —, sinon le texte, confirmeraient notre manière de penser.

sification des êtres vivants qui reposerait strictement et seulement sur l'aspect quantitatif des critères choisis :

viendrait-il à l'idée d'un botaniste d'admettre que deux pieds de la marguerite, *Leucanthemum vulgare*, l'un développé en plaine, l'autre en montagne, soient deux « espèces » différentes, sous prétexte que l'un est normal, l'autre nain [15] ?

Le même botaniste n'admettrait pas plus de faire deux espèces différentes de la pomme de terre — *Solanum tuberosum* — selon qu'il examinera un exemplaire tubérosé par la présence de micorrhizes ou un exemplaire affranchi de symbiose [16].

L'espacement géographique des découvertes, les espèces animales différentes, premiers hôtes décrits, sont certainement à la base des concepts qui ont amené à séparer à nouveau les *Brucella* un instant regroupées [4, 17].

CONCLUSIONS

Ces expériences ne sauraient, en aucune façon, permettre un doute sur la valeur pratique des méthodes de Huddleson d'identification des *Brucella*. En effet, les souches que nous avons étudiées et leurs colonies « colorants » ont été plusieurs fois identifiées à nouveau (142 identifications en atmosphère normale et en atmosphère enrichie en CO₂ pour 21 souches) et les résultats obtenus ont toujours été identiques.

Si, pour les besoins de la technique quotidienne, pour les services courants que le Laboratoire doit rendre aux médecins, vétérinaires ou hygiénistes, l'acceptation pragmatique de la division du « genre » *Brucella* en « espèces » à caractères fixes est utile et même indispensable, *il ne nous paraît pas que ce fait pratique réponde à une réalité profonde*.

Ni les critères choisis, ni les résultats de nos expériences n'autorisent à admettre l'existence scientifique de ces espèces alléguées.

D'une utilité incontestable dans la pratique, cette séparation artificielle est devenue, grâce à l'anthropocentrisme inconscient qui nous dirige trop souvent, une vérité scientifique.

La ségrégation « huddlesonienne » des *Brucella* en trois espèces est un exemple, probablement unique par sa netteté, de la confusion qui peut se produire dans les meilleurs esprits entre le *donné* (des colorants, à une certaine concentration, élisent un certain nombre d'éléments cellulaires le plus souvent assez nombreux pour donner une réponse typique, grâce à un premier tri par l'animal vecteur) et le *réel* : il n'y a pas de différences fondamentales suffisantes pour permettre, ailleurs que sur le plan pratique le plus strict, une discrimination *spécifique* des *Brucella*.

RÉSUMÉ.

Plusieurs expériences portant sur l'identification de colonies de *Brucella* apparues après ensemencement par des souches typiques ou atypiques, soit sur Bacto-tryptose-agar additionné de thionine ou de fuchsine basique, soit sur milieu de Petragnani, montrent que les caractères de Huddleson des colonies-filles ne sont pas les mêmes que ceux de la souche-mère ; l'apparition et le groupement des nouveaux caractères semblent ne pas dépendre des caractéristiques de la souche originelle ; ils ne dépendent pas non plus du colorant présent dans le milieu où les colonies ont été prélevées.

La transformation d'une souche atypique de *Br. abortus* en *Br. melitensis* a pu être obtenue par passage dans l'organisme de cobayes ou d'ovins.

De l'ensemble de ces résultats et de l'examen des critères choisis pour différencier les *Brucella* — tous sont uniquement quantitatifs —, on peut conclure à la valeur pragmatique seule de cette différenciation : la séparation des *Brucella* en trois espèces ne repose sur aucune épreuve scientifiquement valable pour une classification de type botanique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] I. F. HUDDLESON. *Am. Publ. Health Assoc.*, Chicago, 1928.
- [2] I. F. HUDDLESON. *Brucellosis in man and animals*. The Commonwealth Fund, éd., New-York, 1943.
- [3] R. M. TAYLOR, M. LISBONNE et G. ROMAN. *Ces Annales*, 1932, **49**, 284.
- [4] A. C. EVANS. *J. Infect. Dis.*, 1918, **22**, 580.
- [5] M. DE SANCTIS. *Boll. Istit. Sieroter.* Milan., 1933, **12**, 846 et 1935, **13**, 113.
- [6] M. LISBONNE et G. ROMAN. *Rev. Micro. appliquée*, 1936, n° 2.
- [7] H. BAUER, cité par B. H. HOYER. *Am. Assoc. for Adv. Sc.*, 1950, p. 21 et 25.
- [8] G. RENOUX et H. QUATREFAGES. *Ces Annales*, 1951, **80**, 182.
- [9] L. CARRÈRE, G. RENOUX et H. QUATREFAGES. *Ces Annales*, 1951, **80**, 321.
- [10] M. LISBONNE, L. NÈGRE, G. ROMAN et R. SEIGNEURIN. *Ces Annales*, 1938, **61**, 70.
- [11] D. E. WILSON et S. A. EVARS. *J. comp. Path. a. Therap.*, 1936, **49**, 336.
- [12] C. E. ZOBELL et K. F. MEYER. *J. Infect. Dis.*, 1932, **51**, 109.
- [13] I. F. HUDDLESON et W. H. STALH. *Techn. Bull., Michigan Agr. exp. Station*, 1943, **182**, 57.
- [14] G. S. WILSON et A. A. MILES. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 1.

- [15] Exemple cité par L. CUÉNOT et A. TETRY. *L'évolution biologique* Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1951, p. 236.
- [16] J. MAGROU. *De l'Orchidée à la Pomme de terre. Essai sur la symbiose*. Gallimard. édit., Paris, 1943.
- [17] K. F. MFYER et E. B. SHAW. *J. Infect. Dis.*, 1920, **27**, 173.

LA CLASSIFICATION DES BRUCELLA. REMARQUES A PROPOS DE L'IDENTIFICATION DE 2 598 SOUCHES

par G. RENOUX (*).

(Centre [OMS/OAA] de Recherches sur la Fièvre ondulante,
Montpellier.)

C'est à Bruce [1], assisté de Lady Bruce, que l'on doit l'isolement, en 1887, de l'agent responsable de la *Fièvre méditerranéenne* de l'homme et de la chèvre, à Malte : ce microbe reçut de Hugues [2] son premier nom, *Streptococcus miletensis*, rectifié quelques années plus tard : *Micrococcus melitensis* [3].

En 1897, au Danemark, Bang décrit le bacille de l'avortement épizootique de la vache : *bacille de l'avortement* [4] dont la synonymie s'enrichit très rapidement : *Bacterium abortus*, *Corynebacterium abortus endemici*, *Alcaligenes abortus*, etc.

Dix-sept ans plus tard, en 1914, Traum [5] découvre aux Etats-Unis, dans des fœtus de porcs, le microbe de l'avortement des truies qu'il baptise *Bacillus abortus*.

L'éloignement géographique des découvertes, les espèces animales hôtes, les descriptions morphologiques des microbes, tout contribuait à faire de ces bactéries des espèces différentes : mais Alice Evans [6] démontrait que ces différences étaient purement arbitraires et que rien ne séparait bactériologiquement l'agent de la Fièvre de Malte de celui de l'avortement des vaches, vérité qui ne fut pleinement admise qu'après la confirmation qu'en donnèrent Meyer et Shaw [7].

A ce stade, seule l'espèce animale d'où l'on isolait le bacille ou celle dominante dans la région considérée permettait de soupçonner, voire même connaître la variété de *Brucella* en cause : *meliensis*, *abortus* ou *suis*.

Il fallut attendre 1927 et les travaux de Huddleson [8] pour avoir des méthodes qui permettent d'identifier la *Brucella* isolée, quelle qu'en soit l'origine.

Ces méthodes de Huddleson permirent aux chercheurs du C. R. F. O. [9] de donner, dès 1932, les résultats de l'identifi-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 novembre 1951.

cation de 256 souches de *Brucella*, et d'en montrer l'intérêt épidémiologique.

A ces techniques, qui sont la base même de l'étude des *Brucella*, se sont ajoutés depuis, l'identification par les sérum monospécifiques obtenus par absorption quantitative [10], par la culture sur milieu de Petragnani [11, 12], ou par la mesure de l'activité urasique [13, 14, 15].

L'étude bactériologique de 2 598 souches de *Brucella* originaire de France ou de l'étranger, isolées de l'homme ou des animaux (tableau I), permet un certain nombre de remarques et sur ces méthodes d'identification et sur la classification des *Brucella* *sensu stricto*.

TABLEAU I. — Répartition de toutes les souches examinées.

TYPES	ESPÈCES ANIMALES								Animaux d'expérience	Totaux généraux
	Homme	Bovins	Caprins	Ovins	Suidés	Équins	Divers (1)	Totaux		
<i>melitensis</i> . . .	4 127	94	180	96	0	0	22	4 516	255	4 771
<i>abortus</i> . . .	413	194	2	2	0	19	9	339	238	577
<i>suis</i> . . .	4	4	0	0	16	0	5	23	30	53
Atypiques . . .	48	37	3	4	0	1	3	96	101	197
Totaux . . .	4 289	323	185	102	16	20	39	4 974	624	2 598

(1) Lapins, lièvres, chiens, poules, etc. .

I. — LES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION.

A. LES MÉTHODES DE HUDDLESON. — a) Besoin en CO_2 des souches de « *Brucella abortus* ». — 60 p. 100 des souches françaises de *Brucella abortus* ont été isolées d'échantillons mis en cultures aérobies, sans l'appoint d'un excès d'anhydride carbonique à l'atmosphère qui surmonte le milieu. Toutes, après le premier repiquage, se développent correctement à l'air libre, sans avoir besoin de ce gaz.

Marr et Wilson [16] attribuent à des modifications génétiques cette aptitude de certaines souches de *Brucella abortus* à proliférer en l'absence de CO_2 .

Il paraît difficile d'accepter que cette hypothèse soit applicable à toutes les souches isolées en France par nos soins. Notons d'ailleurs que les souches américaines en notre possession (par

exemple, NIH 14, NIH 63, NIH 86, NIH 87, NIH 160 dues à l'obligance du Dr Carle) nécessitent toujours cette atmosphère de CO₂ pour cultiver malgré de nombreuses tentatives d'adaptation. Ne s'agirait-il pas plutôt d'un comportement propre aux souches françaises ?

b) *Inhibition par les colorants et dégagement d'hydrogène sulfuré.* — La technique suivie est toujours semblable, utilisant le même milieu et les mêmes colorants [9, 17].

Les 2 598 souches, à quoi s'ajoutent 142 souches « fabriquées » [18], ont permis 3 920 examens ; il y eut donc 1 180 épreuves recommencées qui concernent le plus souvent l'identification à neuf d'échantillons conservés depuis longtemps au laboratoire.

Les nouveaux tests sont toujours encadrés par l'examen de souches d'isolement récent : 989 résultats sont identiques aux premiers, 191 (soit 18,4 p. 100) sont différents.

18,4 p. 100 des identifications faites à neuf donnent des résultats autres que le premier examen, correspondant à ce que l'on pouvait attendre, fait sur des souches fraîchement isolées.

Ce qui nous permet d'insister sur un point important.

Les techniques d'Huddleson pour l'identification des « Brucella » n'ont de valeur qu'autant qu'elles sont pratiquées sur des souches isolées ; dans les autres cas, si l'on n'a pas pris des précautions spéciales telles que la conservation en milieu de Legroux [19] ou, mais nous n'en avons pas l'expérience, la dessiccation par le froid ou dans le vide, les souches de *Brucella* peuvent se modifier spontanément et ne plus présenter leurs caractères typiques : les voyages, la chaleur, le début de dessiccation des milieux nous semblent être des causes favorisantes.

Nous avons montré, d'autre part, combien il était facile d'obtenir des colonies-filles dont les caractères diffèrent de ceux de la souche-mère, soit en prélevant des colonies apparues sur des milieux en principe inhibiteurs, soit par passages sur les animaux [18].

Ces faits nous ont amené à l'opinion, partagée par W. W. Spink (1), que pour standardiser les méthodes de Laboratoire en matière de *Brucella*, plutôt que de faire voyager des souches étalons qui paraissent sujet à caution, dans l'état actuel de la technique, il serait certainement préférable d'échanger des techniciens et de les voir à l'œuvre sur place.

B. MILIEU DE PETRAGNANI. — Lisbonne et Roman [12] concluent à la valeur complémentaire de la méthode de M. de Sanctis [11] essayée sur 130 souches de *Brucella* : *melitensis*

(1) Communication verbale, août 1951.

pousse très bien sur milieu de Petagnani, les autres variétés ne s'y développent pas. Cette technique d'appoint aiderait à classer les souches atypiques.

Nous avons repris cette étude sur 163 souches : 131 typiques et 32 atypiques.

95 souches de *Br. melitensis* : 1 ne cultive pas ; concordance : 99 p. 100 ;

25 souches de *Br. abortus* : 21 ne cultivent pas, 4 cultivent ; concordance : 84 p. 100 ;

11 de *Br. suis* : 6 ne cultivent pas, 5 cultivent ; concordance : 55 p. 100.

De l'examen de 131 souches de *Brucella* typiques quant à leurs caractères d'Huddleson, nous tirerons des conclusions moins optimistes que Lisbonne et Roman puisque la discordance générale est de 7,6 p. 100 (10/131) pour atteindre 45 p. 100 avec les souches de *Brucella suis* à notre disposition.

Les résultats de la culture sur milieu de Petagnani de 32 souches atypiques sont les suivants :

CARACTÈRES DE HUDDLESON	MOMBRE de souches	CULTURES SUR PETRAGNANI	
		+	-
a) Tous positifs.	17	5	12
b) T - F + SH ₂ -	11	3	8
c) T - F - SH ₂ +	1		1
d) Seuls les contrôles +	3	2	1

T, milieu à la Thionine ; F, milieu à la Fuchsine basique.

A supposer que toutes les souches de la catégorie a) fussent des *Brucella melitensis* atypiques, le milieu de Petagnani n'aurait permis de confirmation que pour 5 sur 17 échantillons, soit dans 35,3 p. 100 des cas.

Ces résultats sont moins favorables que ceux des auteurs déjà cités ; ils nous incitent à supprimer l'emploi du milieu de Petagnani pour l'identification des souches de *Brucella* qui n'aboutit, en fin de compte, qu'à l'introduction d'une complication supplémentaire, quoique faible, sans bénéfice réel.

C. MESURE DE L'ACTIVITÉ URÉASIQUE. — A la suite de Bauer [13], de Pacheco et Thiago de Mello [14], nous avons montré [15] l'intérêt que pouvait présenter le dosage semi-quantitatif de l'activité uréasique des diverses variétés les plus communes de

Brucella (2). Une nouvelle série de 58 souches (30 *Br. melitensis*, 16 *Br. abortus*, 12 *Br. suis*) complète le premier travail.

Cette recherche se fait en milieu de Fergusson qui se recommande par la facilité de sa préparation et de son emploi. Le tableau ci-joint résume ces résultats :

TYPES	SOUCHES	MOYENNE en minutes	LIMITES en minutes
<i>melitensis</i>	30	4,10	0,30 à 19
<i>abortus</i>	16	24,30	11 à 72
<i>suis</i>	12	1	0,30 à 4

Les chiffres de ce deuxième tableau ne diffèrent pas très sensiblement de ceux déjà publiés. Les conclusions de cette série sont les mêmes que celles que l'on pouvait tirer de notre première étude.

Cette méthode peut, et même doit s'ajouter aux méthodes classiques d'identification des *Brucella*. A elle seule, elle est incapable d'identifier correctement une *Brucella*.

D. IDENTIFICATION SÉROLOGIQUE. — Les trois espèces de *Brucella* contiennent chacune, en proportions variables, les deux mêmes antigènes et leur identification sérologique repose sur l'emploi de sérum monospécifiques anti-*melitensis* ou anti-*abortus* absorbés. Cette méthode est surtout employée dans les pays de langue anglaise. Les résultats obtenus par Wilson [10] et ses collaborateurs avec des souches du C. R. F. O., que leur avait fournies M. Lisbonne, ont été tels qu'ils ne nous ont pas incité à poursuivre : des souches provenant du sud de la France, *melitensis* classiques par leurs réactions d'Huddleson, sont sérologiquement étiquetées *Br. abortus*. Les conversations que nous avons pu avoir avec divers spécialistes de la brucellose, qui voulaient bien avouer que de tels incidents n'étaient pas rares dans leur pratique personnelle, ne sont pas non plus pour nous convaincre d'utiliser une méthode, si souvent en contradiction avec les techniques classiques d'Huddleson, et qui ne peut que rendre plus difficile une question qui n'est déjà pas si simple par elle-même.

Ajoutons que ces réactions ne permettent pas de séparer *Brucella suis* de *Brucella abortus* : *Brucella suis* est agglutiné par

(2) C'est par erreur que dans le travail cité la souche *Br. abortus* B 55 figure sur le tableau des souches atypiques. Comme le montrent ses caractères, B 55 est *Br. abortus* typique.

le sérum anti-*abortus*, avec cependant des exceptions, par exemple la souche *Brucella suis* P2 de Weybridge.

II. — SOUCHE ATYPIQUES.

Nous entendons par « souche atypique » une souche de *Brucella* dont les caractères d'identification ne coïncident pas avec ceux des types classiques d'Huddleson.

Le tableau I montre que 96 souches sur 1 974 (soit 4,7 p. 100), isolées de l'homme ou des animaux, sont « atypiques ». Encore avons-nous classé *Brucella melitensis* typiques les souches capables cependant de donner un dégagement abondant d'hydrogène sulfuré pendant vingt-quatre heures.

Ces souches peuvent être rangées en plusieurs catégories (tableau II) ; deux de ces catégories sont les plus importantes :

TABLEAU II. — Caractères et origines des souches « atypiques » de *Brucella*.

CARACTÈRES	ORIGINES							Taux
	Humaines	Bovines	Caprines	Ovines	Équines	Divers		
1° Caractère <i>melitensis</i> mais SH ₂ + 2 à 4 jours.	23	21	0	1	1	1		47
2° Caractère <i>abortus</i> pas de SH ₂	17	10	1	3	0	2		33
3° Tous caractères +	6	0	1	0	0	0		7
4° Colorants —, SH ₂ ++	1	4	0	0	0	0		5
5° Colorants ±, SH ₂ — + +	0	1	0	0	0	0		1
6° Colorants T + F —, SH ₂ —	0	1	1	0	0	0		2
7° Colorants T + F —, SH ₂ +	1	0	0	0	0	0		1
Taux	48	37	3	4	1	3		96

T, culture sur milieu à la thionine; F, culture sur milieu à la fuchsine basique.

L'une est composée de 47 souches à caractère *melitensis* par leur comportement sur milieux additionnés de thionine ou de fuchsine, mais qui fournissent un dégagement important de SH₂ pendant plus de deux jours.

L'autre, forte de 33 souches *Br. abortus* sur les milieux inhibiteurs, mais qui ne produisent pas d'hydrogène sulfuré.

Les autres catégories, moins fournies, se rapportent finalement à toutes les combinaisons possibles des divers tests d'identification selon Huddleson.

On remarquera que dans ce tableau figurent 3 souches qui ont les caractères de *Brucella suis* :

- 1 isolée d'un homme (*H.* 609), *Brucella suis*, type américain ;
- 2 (1 bovine, *B.* 278 ; 1 caprine, *C.* 70), *Brucella suis*, type danois.

Jusqu'à présent, il n'a pas été possible, en France, de trouver un porc atteint de brucellose, aussi avons-nous préféré considérer ses souches comme « atypiques » avec d'autant plus de raisons de le faire que l'hypothèse de l'infection par un vaccin vivant commercial ne pouvait être retenue dans aucun des 3 cas.

De telles souches « atypiques » sont assez couramment rencontrées, en Italie par exemple ; nous en avons reçu de l'Etat d'Israël ; quelques auteurs ont signalé les différences de comportement des souches selon leur origine (*Cf.* Wilson et Miles [20]) ; Huddleson [21] en fait mention rapide.

Il ne nous semble pas qu'on ait suffisamment étudié ces souches : leur importance théorique et pratique nous semble assez grande ; leur étude complète devrait permettre des conclusions sur la valeur réelle des méthodes d'identification des *Brucella*.

Ni la culture sur milieu de Petragnani, ni le dosage de l'uréase, ni non plus l'identification sérologique ne permettent à coup sûr de rattacher une quelconque de ces souches « atypiques » à un des trois types connus. Leur place dans la classification actuelle reste toujours incertaine ; leur petit nombre permettrait-il de créer des types nouveaux ?

CONCLUSIONS.

Les méthodes de Huddleson (besoin en CO₂, dégagement d'hydrogène sulfuré, action inhibitrice des colorants) *sont à la base d'une classification pratique des souches de Brucella récemment isolées.* Elles permettent de ranger les *Brucella* dans une des trois catégories usuelles dans 95 p. 100 des cas si on considère le chiffre global des souches examinées, ce pourcentage tombant à 88,6 p. 100 pour les souches d'origine bovine (37 souches atypiques sur 323).

Les autres méthodes nous semblent d'un moins grand intérêt pratique, seul le dosage de l'activité uréasique peut rendre service en permettant une opinion rapide, mais provisoire.

Les différences qui séparent les *Brucella* ne sont que quantitatives. Sous la réserve que les échantillons soient étudiés dans la même phase *smooth* :

Toutes les *Brucella* ont la même composition chimique dans l'état actuel de la question [22] ;

Toutes les *Brucella* ont la même composition antigénique, les

antigènes A et M étant en proportions variables selon le type considéré [23] ;

Toutes les *Brucella* (tableau I) infectent indifféremment les animaux sensibles (*Cf.* également [24]) ;

Toutes les *Brucella* possèdent une uréase.

Des artifices simples permettent de passer d'un type à l'autre ; 5 p. 100 des souches (11 p. 100 si elles sont d'origine bovine) sont inclassables.

Une classification zoologique, botanique ou bactériologique ne peut et ne doit se baser sur des quantités [18], mais seulement sur des qualités différentes.

Ce ne sont d'ailleurs que des considérations d'ordre pratique (« sake of convenience » Wilson), qui fassent admettre la division en trois espèces principales du genre *Brucella* : selon le pays [25, 26] il existe des variations considérables dans le comportement des souches ; les différences qui séparent les deux variétés de *Brucella suis* (danoise et américaine) sont aussi grandes que celles qui existent entre les autres espèces de *Brucella*.

Cet ensemble de faits qui, répétons-le, n'enlèvent rien à la valeur pratique des méthodes de Huddleson appliquées à des souches fraîchement isolées et dont l'emploi est indispensable pour la pratique courante et l'épidémiologie, nous amène à proposer la classification suivante du genre *Brucella* :

Brucella, Meyer et Shaw.

Petits bacilles immobiles, encapsulés, asporulés, parfois coccobacillaires ; Gram-négatif. Culture généralement pauvre sur les milieux ordinaires, nécessitant le plus souvent des milieux spéciaux. Aérobies, ne se développent pas en anaérobiose stricte : la culture est parfois favorisée par la présence de CO₂. Ne liquéfient pas la gélatine. Peu ou pas d'action sur les glucides ; utilisent l'urée en général. Parasites stricts ; ils sont les agents d'infections caractéristiques chez l'homme ou les animaux.

Espèce type : *Brucella brucei* (n. sp.).

Le genre *Brucella* comprend trois espèces :

I. *Brucella brucei* (n. sp.). — Bacilles ou coccobacilles de 0,5 à 0,8 micron de large, à bouts arrondis, isolés, en petits groupes ou courtes chaînes. Asporulés, encapsulés dans certaines phases. Gram-négatif, ils présentent parfois une coloration bipolaire. Aérobies stricts, ils ont parfois besoin d'une atmosphère contenant 10 p. 100 de CO₂. Le départ des cultures est lent et ils ne cultivent correctement que sur des milieux spéciaux. Utilisent une partie du glucose qui leur est fourni, ne fermentent aucun autre glucide. Hydrolysent l'urée, ne liquéfient pas la gélatine.

En phase *smooth* (non agglutinée par la chaleur ou la trypaflavine) sont spécifiquement agglutinés par un sérum anti-*Brucella*.

Pathogènes pour l'homme et les animaux (Brucelloses). Quatre variétés principales :

Br. brucei, variété *melitensis* : ancien *Br. melitensis*.

Br. brucei, variété *abortus* : ancien *Br. abortus*.

Br. brucei, variété *suis* : ancien *Br. suis* type américain.

Br. brucei, variété *thoimseni* [26] : ancien *Br. suis* type danois.

Nous proposons également :

Br. brucei, variété *lisbonnei* (3) pour les souches qui, cultivant sur milieux additionnés de thionine ou de fuchsine basique, donnent un abondant dégagement de SH₂ pendant deux jours ou plus.

II. *Brucella bronchiseptica* (Ferry), avec la définition qu'en donne le manuel de Bergey [27].

III. *Brucella tularensis* (Topley et Wilson). — Cette dernière espèce étant en attente, jusqu'au moment où l'étude plus complète de ses souches permettra de trancher de son appartenance au genre *Pasteurella* ou au genre *Brucella*.

Une telle classification n'amènerait aucune complication à l'état de fait existant, les méthodes jusqu'ici utilisées pour les identifications restent valables en raison des services qu'elles rendent : pour les besoins de la clinique le diagnostic de brucellose demeure. Peut-être cette classification éviterait-elle, au contraire, de voir porter un diagnostic de brucellose à *Brucella abortus* au vu d'une réaction de Wright, sous le prétexte que l'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus*, puisque aussi bien le séro-diagnostic usuel ne permet pas de séparer les diverses variétés de *Brucella* les unes des autres.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. BRUCE. *Practitioner*, 1887, **39**, 161-170.
- [2] M. L. HUGUES. *Lancet*, 1892, **2**, 1265-1266.
- [3] M. L. HUGUES. *Ces Annales*, 1893, **7**, 628-639.
- [4] B. BANG. *Zeitschr. Tiermed.*, 1897, **1**, 241-278.
- [5] J. TRAUM. *Annual Rep. of the Chief*, Bureau of Anim. Indust., U. S. Dep. Agr., 1914, 30.
- [6] A. C. EVANS. *J. Infect. Dis.*, 1918, **22**, 580.
- [7] K. F. MEYER et E. B. SHAW. *J. Infect. Dis.*, 1920, **27**, 173.
- [8] I. F. HUDDLESON et E. ABELL. *J. Bact.*, 1927, **43**, 130. — I. F. HUDDLESON. Symposium on Undulant Fever. *Am. Publ. Health Assoc.*, Chicago, 1928.
- [9] R. M. TAYLOR, M. LISBONNE et G. ROMAN. *Ces Annales*, 1932, **49**, 284.

(3) En hommage à notre Maître, M. Lisbonne, qui avait voué sa vie à l'étude des *Brucella*.

- [40] G. S. WILSON. *J. Hyg. Cambridge*, 1933, **33**, 516.
- [41] M. DE SANCTIS. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, 1933, **42**, 846.
- [42] M. LISBONNE et G. ROMAN. *Rev. Microb. appliquée*, 1936, n° 2.
- [43] H. BAUER, Ph. D. THESIS. *University of Minnesota*, 1949.
- [44] G. PACHECO et M. THIAGO DE MELLO. *J. Bact.*, 1950, **59**, 689.
- [45] G. RENOUX et H. QUATREFAGES. *Ces Annales*, 1951, **80**, 182.
- [46] A. G. MARR et J. B. WILSON. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **75**, 438-440.
- [47] M. LISBONNE. *IX^e Congrès Féder. Soc. Sc. méd. Afrique du Nord*, Oran, 1939.
- [48] G. RENOUX, L. CARRÈRE et H. QUATREFAGES. *Ces Annales*, 1952, **82**, 277.
- [49] L. CARRÈRE, G. RENOUX et H. QUATREFAGES. *Ces Annales*, 1951, **80**, 321.
- [50] G. S. WILSON et A. A. MILES. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology*, Edward Arnold, éd., Londres, 1948, **1**, 814-837.
- [51] I. F. HUDDLESON. *Brucellosis in man and animals*. The Commonwealth Fund., éd., New-York, 1943, 50.
- [52] I. F. HUDDLESON. *Brucellosis in man and animals*. The Commonwealth Fund., éd., New-York, 1943, 54-62.
- [53] G. S. WILSON et A. A. MILES. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 1.
- [54] Groupe Mixte FAO/OMS d'Experts sur la Brucellose. *Organisation Mondiale de la Santé, Rapport technique n° 37*, mai 1951, 6.
- [55] K. F. MEYER et C. E. ZOBELL. *J. Infect. Dis.*, 1932, **51**, 72.
- [56] A. THOMSEN. *Rev. gén. Méd. Vét.*, 1931, **40**, 457 ; *Acta Path. et Microb. Scand.*, 1934, suppl. 21.
- [57] Bergey's *Manual of determinative Bacteriology*. Baillière, Tyndall et C°, éd., Londres, 6^e édition, 1948, 562.

PURIFICATION DE LA TOXINE ET DE L'ANATOXINE TÉTANIQUES

par A. TURPIN, M. RAYNAUD et M. ROUYER (*).
(avec la collaboration technique de R. PÉRY).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

L'obtention des toxines à l'état pur présente un intérêt théorique et pratique indiscutable. La purification des principales exotoxines et la détermination de leurs caractéristiques physico-chimiques ont été réalisées au cours de ces dernières années. Eaton [1] et Pappenheimer [2] ont préparé une toxine diptérique purifiée. Lamanna [3] et Abrams [4] ont réalisé la cristallisation de la toxine botulinique. La toxine de la scarlatine [5] et la streptolysine [6] ont aussi été purifiées.

Les travaux de Pillemeyer, Wittler, Burrell et Grossberg [7 à 11] ont abouti à la cristallisation d'une toxine tétanique présentant les caractères que l'on peut exiger pour affirmer avec une haute probabilité la pureté d'une protéine.

Les méthodes mises en œuvre pour la purification sont assez simples sur le plan théorique, mais la réalisation pratique reste difficile : la très faible concentration des toxines dans le milieu initial et l'importance des impuretés à éliminer obligent, en effet, à travailler sur des volumes considérables de matière première. Nous avons recherché un procédé de purification de la toxine et de l'anatoxine tétaniques qui puisse être appliqué en utilisant comme matériel de départ la toxine brute préparée à l'Institut Pasteur.

Les conditions que nous réclamions *a priori* pour le choix de la méthode étaient assez sévères : elle devait pouvoir être ultérieurement confiée à du personnel technique de qualification moyenne et standardisée de manière à fournir des résultats réguliers.

Les travaux de Pillemeyer et de ses collaborateurs nous ont fourni les éléments indispensables à cette recherche. Les caractéristiques de la toxine pure qu'ils ont établies permettent, en effet, de juger à chaque stade du degré de purification réalisé.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 juillet 1951.

Nous exposons ici de façon aussi résumée que possible les résultats d'une série d'essais.

TECHNIQUES.

La toxine tétanique brute utilisée provenait du Service du Tétanos. Elle a été préparée sur milieu à base de mélange de digestion pepsique et de digestion papainique de viande et de foie de bœuf, selon Prévot et Boorsma [12].

Pour la digestion pepsique : on hache finement 4 kg de viande de bœuf dégraissée et 1 kg de foie de bœuf frais. On ajoute 18 l d'eau du robinet. On acidifie avec 165 cm³ d'acide chlorhydrique concentré pur (concentration 8 p. 100 environ) et on ajoute 15 g de pepsine Vaillant de titre 500. On porte au bain-marie à 47°5 pendant vingt heures, dans des cuves en acier inoxydable. On chauffe ensuite à 85° pour arrêter la digestion et on filtre le jus décanté sur papier Durieux mou. On ajuste le pH à 5,8 au rouge de méthyle, avec de la lessive de soude pure.

Pour la digestion papainique : on hache finement 5,200 kg de viande de bœuf et 1,200 kg de foie de bœuf frais. On ajoute 18 l d'eau du robinet déjà portés à 47°5, puis 15 g de papaine. On élève graduellement pendant une heure la température de 47°5 à 80°, on filtre le jus décanté sur papier Durieux mou. On ajuste le pH à 5,8 au rouge de méthyle, avec de la lessive de soude pure.

Les deux digestions sont mélangées dans les proportions de trois parties de digestion pepsique pour une partie de digestion papainique. Le mélange est glucosé à 8 g par litre et réparti en flacons de 5 l remplis à 4,5 l, avec 1 g de sang sec de cheval par flacon. On stérilise vingt minutes à 110°.

Voici quelques caractéristiques de ce bouillon V. F. :

Extrait sec	30 à 45 g p. 1 000
N total	5 à 7 g p. 1 000
N ammoniacal	0,029 à 0,17 g p. 1 000
N aminé (Sörensen).	0,9 à 1,2 g p. 1 000

Après autoclavage, on laisse les flacons refroidir lentement jusqu'à 33°. On ensemence et on porte à l'étuve à 33° pendant onze jours. Au bout de ce temps, la toxine est filtrée sur disque de cellulose amiantée.

La souche tétanique « R » est entretenue sur bouillon pepsique additionné de 5 g de cervelle de veau par tube de 10 cm³ de bouillon. Après désaération à la machine à vide, les tubes sont scellés, mis quarante-huit heures à l'étuve à 33°, puis à l'obscurité à 18-20°.

Pour en tirer les souches d'ensemencement, on choisit une

souche de trois mois environ, provenant d'une lignée ayant donné une toxine de 40 unités au minimum. On ensemence avec cette souche des souches-filles en tubes désaérés et scellés, dont on tire des souches petites-filles en tubes ouverts de 25 cm³ de bouillon-cervelle qui, après quarante-huit heures à 33°, serviront à l'ensemencement des flacons de bouillon à raison d'un tube par flacon.

Cette toxine titrait en moyenne 500 000 à 1 000 000 DMm et 40 à 60 unités floculantes (U. F.) au centimètre cube. Son pH variait de 6,6 à 7,2.

La DMm a été déterminée sur souris de 18 à 20 g en prenant les précautions suivantes, rappelées par Pillemeyer : les dilutions ont été faites en eau peptonée à 1 p. 100 additionnée de 9 p. 1 000 de chlorure de sodium, pour éviter les altérations de la toxine que l'on observe parfois en eau distillée ou en eau physiologique simple [13], et les opérations de dilution ont été effectuées à la chambre froide à 0°. On a changé de pipette pour chaque dilution en vue d'éviter l'adsorption éventuelle de la toxine sur le verre, signalée par Mutermilch [14]. La durée d'observation des animaux était de quatre jours. Seuls ont été utilisés, pour le calcul de la DMm, les animaux ayant présenté au cours de cette période des signes indiscutables de tétons.

La capacité de combinaison (Lf) et le temps de flocculation optimum (Kf) ont été déterminés par la méthode de Ramon. Des quantités croissantes de sérum ont été ajoutées à des quantités fixes de toxine (1 cm³ et 2 cm³). Les sérums antitétaniques utilisés titraient 250 U. F. et 100 U. F. au centimètre cube.

Les tampons acide acétique-acétate de sodium de force ionique déterminée ont été préparés en utilisant les nomogrammes de Boyd [15]. Les concentrations en ion hydrogène ont été déterminées à l'électrode de verre après avoir réchauffé l'échantillon à 25°. Les centrifugations ont été faites sur appareils ordinaires, à 0°, — 5° et — 15°. Des bains à température constante ont été utilisés pour maintenir à la température désirée les solutions en cours de fractionnement.

Le test de flocculation ne distingue pas la toxine du toxoïde, et les produits étudiés peuvent représenter des mélanges en proportions variables de toxine et de toxoïde. La détermination de la DMm ou de la DM50 est la seule mesure valable de l'activité de la toxine. Le rapport $\frac{\text{DMm}}{\text{Lf}}$ renseigne sur la présence éventuelle de dérivés atoxiques et floculants dans un échantillon de toxine donné.

Une augmentation du temps de flocculation d'une fraction comparée à la précédente, ou avec la toxine-mère, est considérée comme un indice d'altération de la toxine ou de l'anatoxine.

RÉSULTATS.

1^o PURIFICATION PAR ADSORPTION SUR PHOSPHATE DE CADMIUM (selon Eaton et Gronau [16], et Pickett, Hoeprich et Germain [17]). — La toxine tétanique est adsorbée sur un précipité de phosphate de cadmium obtenu par addition au milieu de culture ajusté à pH 7-7,6 d'une solution de chlorure de cadmium. L'éluation est réalisée par un tampon phosphate (solution de phosphate de soude à 2 p. 100, de pH 7,8). Voici les caractéristiques des produits obtenus, sous forme de nombre de DMm par milligramme d'azote.

TABLEAU I.

	BOUILLON DE DÉPART	ELUAT
Essai 8	$4,2 \times 10^5$	2×10^6
Essai 9	4×10^5	2×10^6
Essai 11	4×10^5	3×10^6
Essai 12	4×10^4	$1,2 \times 10^6$
Essai 13	4×10^5	$2,7 \times 10^5$
Essai 18	$1,2 \times 10^5$	2×10^6
Essai 20	$2,5 \times 10^5$	$8,7 \times 10^6$
Essai 21	5×10^4	$1,2 \times 10^6$

On voit que le degré de purification réalisé par ce procédé avec la toxine brute utilisée est assez faible, de l'ordre de 20 à 40 en moyenne. D'autre part, le rendement de l'opération est irrégulier et le plus souvent mauvais : on récupère entre 10 et 20 p. 100 de la toxine initiale malgré plusieurs éluations.

Nous n'avons pas cherché à perfectionner cette méthode et à l'adapter à notre toxine, la technique de Pillemér nous ayant donné de meilleurs résultats, tout au moins dans ses premiers stades.

2^o PURIFICATION PAR LA MÉTHODE DE PILLEMER. — Nous avons suivi la technique de cet auteur, sauf légères modifications nécessitées par la nature de notre équipement. La nomenclature employée est celle de Pillemér. Le premier précipité T P₁ est réalisé à pH = 5,0-5,25, force ionique 0,09, température — 5°, en présence de 40 p. 100 de méthanol (purifié selon Winkler [18]) dans une cuve en acier inoxydable placée dans une chambre froide à — 5°.

Le précipité obtenu est de couleur brun foncé. Il ne se redissout pas entièrement dans l'acétate 0,150 M de pH = 6,9. La fraction soluble est obtenue en remettant ce précipité en suspension dans un très faible volume de ce tampon : 1/30 à 1/100 du volume initial.

TABLEAU II.

	U.F.	Kf min.	D Mm × 10 ⁶	mg N/cm ³	U.F. mg N	D Mm × 10 ⁶ mg N	D Mm U.F.
<i>Expérience 3 :</i>							
Toxine mère . . .	35	120	0,25	5,160	6,7	0,048	0,74
T P _I	600	120	2	0,682	880	2,9	0,33
T P _{II}	500	120	4	0,340	1 470	2,9	0,20
<i>Expérience 4 :</i>							
Toxine mère . . .	34	120	0,5	6,12	5,55	0,08	1,40
T P _I	1 500	120	20	0,70	2 440	28	1,30
T P _{II}	1 500	120	15	1,29	1 850	18	1
<i>Expérience 5 :</i>							
Toxine mère . . .	50	120	0,75	4,93	10	0,15	1,50
T P _I	2 000	120	20	1,25	1 600	16	1
T P _{II}	2 000	120	20	0,31			1
<i>Expérience 6 :</i>							
Toxine mère . . .	50	120	0,5	5,16	9,6	0,09	1
T P _I	350	120	3	0,70	500	7,40	1,42
T P _{II}	200	120	3	0,25	790	11,90	1,50
<i>Expérience 7 :</i>							
Toxine mère . . .	62	120	1,2	5,012	12,4	0,24	1,90
T P _I	350	120		0,560	625		
T P _{II}	350	120		0,175	2 000		
<i>Expérience 8 :</i>							
Toxine mère . . .	37,5	120	0,8	5,250	7,4	0,15	2,1
T P _I	640	120		0,763	841		
T P _{II}	380	120		0,210	1 809		
<i>Expérience 9 :</i>							
Toxine mère . . .	50	120	0,8	4,540	11	0,17	1,6
T P _I	500	120	9	0,510	980	17	1,8
T P _{II}	500	120	9	0,228	2 180	39	1,8
<i>Expérience 10 :</i>							
Toxine mère . . .	40	120	0,6	5,400	7,6	11	1,5
T P _I	350	120	4,5	0,523	673	8	1,3
T P _{II}	250	120	4,5	0,247	1 200	21	1,8

Nous avons constaté que toute la toxine présente dans le précipité peut être redissoute en traitant ce dernier trois fois successivement par ce faible volume de tampon. On obtient ainsi une

solution (S_2) qui contient toute la toxine initiale sous un volume égal au 1/10 ou au 1/30 du volume initial.

La deuxième précipitation a été effectuée dans les conditions suivantes : pH = 5,0 ; force ionique, 0,05 ; température, — 5° ; méthanol purifié, 15 p. 100. Le précipité $T_{P_{II}}$ est redissous dans un volume d'acétate 0,150 M pH = 6,9 égal au volume employé pour la redissolution du T_{P_1} (solution S_3).

Ces deux premières précipitations sont faciles à effectuer. Appliquées à la toxine brute de l'Institut Pasteur, elles nous ont fourni des résultats très réguliers avec un rendement élevé (90 à 100 p. 100).

On peut simplifier la préparation en réalisant la première précipitation dans les conditions suivantes : pH non ajusté (6,6 à 7,2 suivant la toxine mère) ; éthanol purifié, 50 p. 100 ; température, — 15°, dans des conditions voisines de celles employées par Modern, Ruff et Gatti [19, 20] pour l'anatoxine.

Le précipité (p_1) obtenu est redissous et la deuxième précipitation est effectuée dans les conditions d'obtention du $T_{P_{II}}$.

TABLEAU III.

	U.F.	$DMm \times 10^6$	$mg\ N/cm^3$	U.F. $mg\ N$	$DMm \cdot 10^6$ $mg\ N$	$DMm \cdot 10^4$ $U.F.$
Toxine mère	32	0,25	5,350	6	0,04	0,7
p_1	122	4,50	0,643	200	2,40	1,4
$T_{P_{II}}$	122	1	0,050	2 440	20	0,81

La purification ultérieure, selon Pillemeyer (stades $T_{S_{III}}$, $T_{S_{IV}}$, P_V), ne nous a fourni que des résultats beaucoup plus irréguliers. Les stades $T_{S_{III}}$ et $T_{S_{IV}}$ ont pu être réalisés dans tous les cas, mais le degré de purification n'a pas toujours été comparable à celui obtenu par Pillemeyer. La baisse des rapports $\frac{U.F.}{mg\ N}$ et $\frac{DMm}{mg\ N}$ observée pour ces stades dans plusieurs cas est l'indice d'une dénaturation de la toxine.

Les conditions optima de température et de force ionique doivent être ici déterminées dans chaque cas : malgré nos efforts, il ne nous a pas été possible d'obtenir des résultats réguliers, permettant une transposition industrielle de la méthode.

Enfin la précipitation finale (stade P_V) n'a pu être obtenue qu'une fois sur 12 essais et avec un rendement très faible. Dans tous les autres cas, il nous a été impossible de récupérer sans

dénaturation la toxine purifiée contenue dans les solutions méthanoliques (stade T S_{IV}), où d'ailleurs elle se conserve bien à — 15°.

Nous donnons ci-dessous le tableau relatif à l'expérience 9, qui nous a fourni une toxine précipitée de pureté élevée.

TABLEAU IV.

	U.F.	D _{Mm} × 10 ⁶	mg N/cm ³	U.F. mg N	D _{Vlm} mg N	D _{Mm} U.F. × 10 ⁶
<i>Expérience 9 :</i>						
Toxine mère . . .	50	0,8	4,540	41	0,17	1,6
T P _I	500	9	0,510	980	47	1,8
T P _{II}	500	9	0,228	2 180	39	1,8
T S _{III}	86	1,5	0,036	2 380	41	1,7
T S _{IV}	76	1	0,021	3 610	47	1,3
P V		0,8	0,014		57	

La précipitation finale de la toxine tétanique sous forme hautement purifiée n'a donc pu être obtenue que très irrégulièrement par application de la méthode de Pillemeyer à la toxine brute de l'Institut Pasteur. Cette constatation est en accord avec les indications fournies par cet auteur lui-même qui a noté que la nature des « impuretés » contenues dans le milieu initial influe sur le succès de l'opération qui, entre ses mains, n'a réussi qu'avec les toxines brutes préparées sur milieu de Mueller et Miller.

Par contre, nous avons noté que la purification réalisée au stade T S_{IV} était souvent très importante avec notre toxine brute. Nous avons alors cherché à précipiter la toxine présente dans ces solutions méthanoliques par divers solvants neutres : alcool méthylique, acétone, à la température de — 15°. Nous avons obtenu des précipités abondants, mais dépourvus de toxicité. Ces précipités, très blancs au moment de leur formation, prennent rapidement une couleur brun foncé et sont insolubles en acétate 0,150 M. Les solvants neutres essayés provoquent donc, même à — 15°, une dénaturation presque complète de la toxine tétanique.

Nous avons alors tenté de récupérer la toxine présente dans les solutions méthanoliques (T S_{IV}) par adsorption. Nous avons essayé le phosphate tricalcique, l'alumine, le phosphate de cadmium, le phosphate d'aluminium. Ces diverses substances ont adsorbé la toxine tétanique de façon variable. Le phosphate d'aluminium, préparé selon Holt [21], nous a permis de réaliser

une adsorption complète de la toxine tétanique, dans les conditions physico-chimiques particulières réalisées au stade T S_{IV}.

Les solutions que nous avions obtenues étaient de : pH = 4,0 ; force ionique, 0,100 ; méthanol, 30 p. 100 ; température, — 15°. L'expérience a été faite avec 10 cm³ ou 50 cm³ de T S_{IV}. On ajoute 50 mg de phosphate d'aluminium fraîchement préparé. On laisse en contact quelques minutes. On centrifuge à — 5°. Le liquide surnageant est transféré dans un nouveau pot à centrifuger et on ajoute à nouveau 50 mg de phosphate d'aluminium. L'adsorption est répétée une troisième fois. Le liquide final obtenu après la troisième centrifugation ne présente plus la moindre toxicité. Les trois culots réunis contiennent toute la toxine présente dans le T S_{IV}. On peut effectuer le dosage de la toxine adsorbée en remettant le phosphate d'aluminium en suspension dans de l'eau physiologique ou de l'acétate 0,150 M ph = 6,9 et en faisant une émulsion bien homogène.

L'éluion quantitative est difficile. L'acétate 0,150 M ph = 6,9, l'eau physiologique, le phosphate $\frac{M}{15}$ de ph 7,6, ne nous ont permis d'éluer que de faibles proportions de toxine.

Par contre, on peut réaliser une éluion totale par emploi d'une solution hypertonique ($NaCl \frac{M}{T}$ citrate $\frac{M}{10}$). Le précipité de phosphate d'aluminium contenant la toxine adsorbée est remis en suspension dans un volume de $NaCl \frac{M}{I}$ citrate $\frac{M}{10}$ égal au volume de T S_{IV} initial. On laisse en contact cinq heures à 0°. On centrifuge. On retrouve toute la toxine dans l'éluat NaCl-citrate.

TABLEAU V.

	DMm $\times 10^6$	mg N/cm ³	DMm mg N $\cdot 10^6$
T S _{IV}	0,6	0,018	34
Expérience 1. Eluat	0,5	0,012	41
Expérience 2. Eluat	0,6	0,013	46
Expérience 3. Eluat dialysé . . .	0,3	0,010	30

Mais il est difficile, par la suite, d'éliminer le chlorure de sodium sans altération de la toxine. La dialyse pendant quarante-huit heures à 0° contre de l'eau distillée entraîne en effet un abaissement de toxicité.

Ces résultats montrent qu'il est possible de récupérer la toxine tétanique à partir des solutions méthanoliques par adsorption sur

phosphate d'aluminium suivie d'élation par une solution hypertonique.

PURIFICATION DE L'ANATOXINE TÉTANIQUE. — L'anatoxine tétnique a été purifiée à partir des anatoxines brutes de l'Institut Pasteur.

Les conditions expérimentales ont été les mêmes que pour la toxine, sauf que la précipitation initiale a été faite à ph = 4,85 ± 0,05.

Ici encore, il est facile d'obtenir des précipités T P₁ et T P_{II} avec régularité. La purification réalisée est importante.

TABLEAU VI.

	U. F.	mg N/cm ³	$\frac{\text{U. F.}}{\text{mg N}}$
<i>Expérience 1 :</i>			
Anatoxine mère.	38	4,360	8
T P ₁	250	0,462	544
T P _{II}	190	0,079	2 400
T S _{III}	25	0,015	1 666
T S _{IV}	20	0,013	1 515
E 5	15	0,008	1 870
<i>Expérience 2 :</i>			
Anatoxine mère.	35	5,439	6
T P ₁	250	0,924	280
T P _{II}	200	0,081	2 470
T S _{III}	40	0,019	2 400
T S _{IV}	25	0,010	2 500
E 5	25	0,029	860
<i>Expérience 3 :</i>			
Anatoxine mère.	30	5	6
T P ₁	200	0,700	300
T P _{II}	150	0,079	1 910
T S _{III}	30	0,017	1 760
T S _{IV}	30	0,015	2 000
E 5	30	0,022	1 360

Nous n'avons pas pu obtenir, au cours de divers essais, le précipité du type P_V. La récupération de l'anatoxine présente dans les solutions méthanoliques (T S_{IV}) est, par contre, facile : l'anatoxine, plus résistante, précipite en effet par 4 volumes d'éthanol ou de méthanol, à — 15°. On obtient un précipité blanc qui se redissout très facilement dans l'acétate 0,150 M ph = 6,9. Mais le

produit obtenu (E 5) présente une baisse du rapport $\frac{\text{U. F.}}{\text{mg N}}$. Ceci

montre que la précipitation par l'alcool méthylique ou éthylique à — 15°, quoique moins néfaste que pour la toxine, entraîne une dénaturation partielle de l'anatoxine. Le produit obtenu est cependant débarrassé de nombreuses impuretés. Son Kf reste beaucoup plus faible que celui de la toxine initiale. Il est donc possible que l'anatoxine ainsi purifiée, malgré la valeur relativement faible du rapport $\frac{\text{U. F.}}{\text{mg N}}$, présente un intérêt pratique réel.

Le pouvoir antigénique des préparations S 3 et E 5 d'anatoxine tétanique est à l'étude. Les produits peuvent être recueillis à l'état solide par lyophilisation. La durée de conservation à l'état lyophilisé sera précisée ultérieurement.

CONCLUSIONS.

1° Il paraît difficile de préparer avec un rendement acceptable une toxine tétanique de pureté élevée, dont les caractéristiques se rapprochent de la toxine tétanique cristallisée préparée par Pillemer (3 600 $\frac{\text{U. F.}}{\text{mg N}}$). Par contre, deux précipitations successives à pH acide en présence d'éthanol ou de méthanol à — 5°, avec redissolution intermédiaire dans un faible volume d'acétate, 0,150 M pH = 6,9, permettent d'obtenir régulièrement à partir de la toxine brute de l'Institut Pasteur, une toxine purifiée, contenant 1 500 à 2 000 $\frac{\text{U. F.}}{\text{mg N}}$.

2° La toxine tétanique, en solution à pH = 4,0, force ionique 0,100, méthanol 30 p. 100, température — 5°, peut être adsorbée quantitativement sur phosphate d'aluminium et éluee par les solutions hypertoniques ($\text{NaCl } \frac{\text{M}}{\text{T}}$ citrate $\frac{\text{M}}{10}$).

3° Une anatoxine tétanique purifiée (1 800 à 2 500 $\frac{\text{U. F.}}{\text{mg N}}$) peut être obtenue facilement à partir de l'anatoxine brute de l'Institut Pasteur par deux précipitations successives à pH acide en présence de méthanol ou d'éthanol, avec redissolution intermédiaire dans un faible volume d'acétate.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. D. EATON. *J. Bact.*, 1936, **34**, 367.
- [2] A. M. JR PAPPENHEIMER. *J. Biol. Chem.*, 1937, **120**, 543.
- [3] C. LAMANNA, O. E. MAC ELROY et H. W. EKLUND. *Science*, 1946, **103**, 613.

- [4] A. ABRAMS, G. KEGELES et G. A. HOTTE. *J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, 63.
- [5] L. E. KREJCI, A. H. STOCK, E. B. SANIGAR et E. A. KROEMER. *J. Biol. Chem.*, 1942, **142**, 785.
- [6] D. HERBERT et E. W. TODD. *Bioch. J.*, 1941, **35**, 1116.
- [7] L. PILLEMER, R. G. WITTLER et D. B. GROSSBERG. *Science*, 1946, **103**, 615.
- [8] L. PILLEMER. *J. Immunol.*, 1946, **53**, 237.
- [9] L. PILLEMER, D. B. GROSSBERG et R. G. WITTLER. *J. Immunol.*, 1946, **54**, 213.
- [10] L. PILLEMER, R. G. WITTLER, J. J. BURRELL et D. B. GROSSBERG. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 205.
- [11] L. PILLEMER et D. H. MOORE. *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 427.
- [12] A.-R. PRÉVOT et H. G. BOORSMA. *Ces Annales*, 1939, **63**, 600.
- [13] S. MUTERMILCH, M. BELIN et E. SALOMON. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 1005.
- [14] S. MUTERMILCH, M. BELIN et E. SALOMON. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 1245.
- [15] W. C. BOYD. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 1035.
- [16] M. D. EATON et A. GRONAU. *J. Bact.*, 1938, **36**, 423.
- [17] M. J. PICKETT, P. D. HOEPFICH et R. O. GERMAIN. *J. Bact.*, 1945, **49**, 515.
- [18] WINKLER. *Berichte*, 1905, **38**, 3612.
- [19] F. MODERN, G. RUFF et A. GATTI. *Monat. für Chem.*, 1950, **81**, 165.
- [20] F. MODERN, G. RUFF et A. GATTI. *Rev. Inst. Bact. Malbran*, 1949, **14**, 180.
- [21] L. B. HOLT. *Lancet*, 1947, **252**, 282.

LE DÉTERMINISME DE LA SPORULATION DE *BACILLUS MEGATHERIUM*

III. L'EFFET D'UNE AÉRATION LIMITANTE SUR LES CULTURES AGITÉES DE DEUX VARIANTES D'UNE MÊME SOUCHE

par N. GRELET (*).

(*Institut Pasteur, Service des Fermentations.*)

INTRODUCTION

Dans les deux mémoires précédents [9, 10], nous avons étudié un seul des variants de notre souche de *Bacillus megatherium*, le variant A.

Dès l'isolement des variants A et B sur moût de bière gélosé à 25°, ils nous étaient apparus différents non seulement par la morphologie des colonies, mais par la propension apparente à sporuler : les colonies rugueuses du variant A ne présentent, après plusieurs jours, qu'une sporulation partielle, tandis que les colonies lisses du variant B se développent rapidement, et coulent au fond du tube en une substance crémeuse qui ne contient presque que des spores.

En milieu synthétique de composition convenable, aéré par agitation, nous avons obtenu la croissance végétative prolongée du variant A ; au contraire, avec le variant B, dans les mêmes conditions, nous avons constaté une sporulation précoce dont le déterminisme ne pouvait être trouvé dans l'épuisement de l'aliment carboné ou la pénurie de l'un des constituants du milieu.

Diverses observations orientèrent notre attention vers l'effet d'une aération insuffisante ; nous devons l'une d'elles à M. A. Lwoff : lorsqu'une microgouttelette de culture est introduite dans la chambre à huile du micromanipulateur, les bacilles sporulent, alors que dans la même culture agitée la croissance se poursuit sans sporulation [16].

Dans le présent mémoire, nous recherchons donc, avec les deux variants dont le comportement paraît à première vue différent, si

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 octobre 1951.

une aération insuffisante, entraînant une limitation de la croissance, peut être un facteur de sporulation.

MÉTHODES

L'origine des variants A et B de la souche ML de *B. megatherium*, la réalisation des stocks d'ensemencement, la composition du milieu témoin chimiquement défini, les conditions d'ensemencement et d'incubation, les techniques des examens et dosages, ont été indiquées dans le premier mémoire [9].

Pour faire varier l'aération des cultures, nous agitons dans des flacons d'Erlenmeyer de 200 cm³ des volumes de milieu de 15, 25, 50, 100 et 200 cm³. Avec les volumes de 100 et 200 cm³ les colons ne restent pas secs, ce qui apporte un obstacle supplémentaire à l'aération.

Bien que les échanges gazeux aient lieu à travers une surface fortement agitée, voici quelques indications numériques correspondant au flacon au repos :

Volume de milieu	15	25	50	100	200 cm ³
Surface libre.	45	47	47	44	22 cm ³
Rapport <u>surface</u> <u>volume</u>	3	2	1	0,5	0,1

Rappelons que les flacons sont incubés à 30° sur un agitateur à mouvement alternatif : 90 oscillations par minute, 9 cm d'amplitude.

Toutes les expériences sont faites sur le milieu synthétique témoin : pH initial 5,8 ; glucose initial, environ 45 g/l.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

L'EFFET SUR LE VARIANT A DE DIVERS DEGRÉS D'AÉRATION. — Le développement des cultures est très efficacement limité lorsqu'on augmente le volume de milieu dans le flacon agité : l'opacité des cultures de vingt-trois heures (tableau I) le montre nettement.

Avec le volume de 25 cm³, nous sommes dans les conditions de la culture témoin antérieurement décrite [9], à cette petite différence près que la contenance du flacon est ici de 200 cm³ au lieu de 150.

Avec le volume de 15 cm³, la croissance est encore plus rapide et le glucose plus vite épuisé qu'avec le volume de 25 cm³ : nous avons, en effet, déjà observé que dans la culture témoin, le taux de croissance est rapidement limité par une aération insuffisante.

Avec un volume de 50 cm³ on observe à vingt-trois heures une légère acidification à pH 5,1 ; la croissance se poursuit lentement et le glucose finit par être épousseté. Durant toute cette période de croissance ralentie, il n'y a pas sporulation, et une fois le glucose

épuisé, le phénomène de pulvérisation granulaire des bacilles, caractéristique des vieilles cultures, masque en partie le déclenchement de la sporulation.

Avec des volumes de 100 et 200 cm³, la croissance est presque complètement arrêtée à une faible opacité par une acidification qui amène le pH à 4,8, dès seize heures, et à 4,2 à soixante-neuf heures. Il ne se produit pas de sporulation.

Il n'est donc pas possible de produire la sporulation du variant A par une aération limitante.

TABLEAU I. — **Effet de l'aération sur la croissance et la sporulation du variant A.**

pH initial : 5,8; glucose initial : environ 45 g/l.

VOLUME en cm ³	DURÉE DES CULTURES			
	23 heures	40 heures	69 heures	
200	pH Glucose g/l. Opacité. Examen	4,3 39,4 2,3 B. n., ch. 4-8.	4,2 2,4 B. n., ch. 4-8.	4,1
100	pH. Glucose g/l. Opacité. Examen	4,85 29,0 6,2 B. n., ch. 2-4.	4,25 24,7 7,3 B. n., ch. 2-4.	4,2
50	pH. Glucose g/l. Opacité. Examen	5,4 43,0 15,4 B. n., ch. 2-4.	5,7 1,8 21,6 B. n., ch. 2-4.	7,0 0 25,5 Granules et débris. Rares sp. incl.
25	pH. Glucose g/l. Opacité. Examen	5,9 4,3 21,9 B. n., ch. 2.	7,35 0 18,1 Sp. incl. en formation dans B. n., ch. 2-4.	8,45 12,5 Sp. libres. Quelques B. n., ch. 1.
15	pH. Glucose g/l. Opacité. Examen	7,5 0 24,8 B. n., ch. 1-2.	7,6 19,6 Sp. libres et quelques incl. B. n. ch. 1-2.	

Opacité : proportionnelle à la densité optique mesurée, elle exprime approximativement la matière sèche en g/l.

Examen microscopique : signification de quelques abréviations : B. n., ch. 4-8 : Bacilles normaux, en chaînes de 4 à 8 éléments. Sp. libres et qq. incl. : Spores libres et quelques spores incluses.

L'EFFET SUR LE VARIANT B DE DIVERS DEGRÉS D'AÉRATION. — Le développement du variant B est limité au même degré que celui du variant A, par l'insuffisance d'aération corrélative à l'augmentation du volume agité (tableau II).

TABLEAU II. — **Effet de l'aération sur la croissance et la sporulation du variant B.**

pH initial : 5,8 ; glucose initial : environ 45 g/l.

VOLUME en cm ³		DURÉE DES CULTURES		
		23 heures	46 heures	69 heures
200	pH	6,0	5,3	4,9
	Glucose g/l	37,5	32,8	32,0
	Opacité	4,6	2,5	2,3
	Examen	B. courts, ch. contourn. Sp. incl.	B. courts, ch. contourn. Sp. incl., quelques libres.	
100	pH	5,85	5,8	6,05
	Glucose g/l	29,4		12,1
	Opacité	5,8	8,9	11,0
	Examen	B. courts, ch. contourn. Sp. incl.	Sp. libres, quelques incl. Quelques B. courts.	
50	pH	6,1	5,6	7,3
	Glucose g/l	20,4		0
	Opacité	11,0	16,0	
	Examen	Sp. incl. dans B. n., ch. 2-4.	Sp. libres, quelques incl. Quelques B. courts.	
25	pH	5,8	7,5	8,35
	Glucose g/l	3,0	0	
	Opacité	17,3	15,9	
	Examen	B. n., ch. 2-4. Quelques jeunes sp. incl.	B. n., ch. 2. Sp. libres.	
15	pH	6,6	8,05	
	Glucose g/l	0		
	Opacité	19,7	16,3	
	Examen	B. n., ch. 4 contourn.	B. n., ch. 2. Quelques sp. libres.	

Examen microscopique : signification de quelques abréviations ; ch. contour. : chaînes contournées, c'est-à-dire chaînes dont les éléments sont disposés en ligne brisée.

Le variant B n'a pas une aussi forte propension que le variant A à réagir à l'asphyxie par une production d'acides organiques qui

acidifient le milieu : seul le flacon contenant 200 cm³ de milieu, dont le développement reste très faible, s'acidifie tardivement un peu, et atteint le pH 4,9 à soixante-neuf heures.

Mais, dès vingt-trois heures, malgré les différences considérables de développement, on trouve des spores incluses dans tous les flacons, sauf dans le flacon le plus aéré, contenant 15 cm³, où la croissance a été la plus rapide et où le glucose est déjà épuisé.

Cette sporulation d'ailleurs n'est à peu près générale que dans le flacon contenant 50 cm³, où le degré d'insuffisance de l'aération paraît optimum pour la sporulation. Au-dessous (25 cm³), l'aération est presque suffisante, mais on conçoit qu'une certaine hétérogénéité puisse subsister à cet égard dans le milieu agité, et que certains germes soient plus sensibles à une aération insuffisante. Au-dessus (100 et surtout 200 cm³), l'asphyxie est telle qu'elle affecte la morphologie des bacilles et paraît en rendre certains inaptes à sporuler.

Nous avons d'ailleurs vérifié qu'une asphyxie rapidement complète ne provoque pas de sporulation.

En bouchant, dès l'ensemencement, avec un bouchon de caoutchouc, un flacon de 200 cm³ contenant 50 cm³ de milieu, on ne permet qu'une croissance limitée : bien qu'il s'agisse toujours du variant B, une légère acidification se produit avec pH 4,9 à trente-deux heures ; les germes, dont aucun n'a sporulé, ont l'aspect habituel dans ces cultures acidifiées (tableau III).

TABLEAU III. — **Effet de l'asphyxie sur la croissance et la sporulation du variant B.**

CONDITION D'AÉRATION	DURÉE DE LA CULTURE 32 heures
50 cm ³ dans flacon de 200 cm ³ , bouchon de caoutchouc après l'ensemencement.	pH 4,9 Glucose g/l. 38,8 Opacité. 3,5 Examen. B. petits et courts, ch. 2-4.
50 cm ³ dans flacon de 200 cm ³ , bouchon de coton.	pH 5,85 Glucose g/l. 20,7 Opacité. 13,5 Examen. Sp. incl. dans B. n., ou courts, ch. 2-4.

Dans une autre expérience, nous avons transvasé une culture de vingt-deux heures, bien développée avec une bonne aération, dans des flacons d'Erlenmeyer de divers volumes, bouchés avec un bouchon de caoutchouc et remis à agiter. Dans le flacon de 50 cm³, 50 cm³ de culture sont soumis à une asphyxie quasi immé-

diate ; il n'y a alors ni acidification, ni sporulation. Dans le flacon de 200 cm³, une réserve d'air de 150 cm³ permet la métabolisation d'une partie du glucose restant ; mais l'opacité n'augmente pas et le pH s'abaisse à 5,3 ; cette asphyxie progressive n'entraîne pas de sporulation.

Nous pouvons donc conclure qu'une aération limitante entraîne la sporulation du variant B ; mais il faut aussi que l'apport d'oxygène soit continu durant le processus de sporogénèse ; celui-ci, en effet, devient impossible dans des conditions d'asphyxie complète.

DISCUSSION

On a souvent décrit des variants, obtenus par dissociation d'une souche, qui présentent à des degrés divers l'aptitude à sporuler, ou l'inaptitude totale [3, 4, 6, 5, 12, 13, 11, 22].

Le fait que certains variants présentent, à première vue, une propension à sporuler que n'offrent pas certains autres, pourrait fournir un argument en faveur d'un déterminisme cyclique par des facteurs internes propres à chaque variant.

Nous montrons que la sporulation de l'un des variants étudiés ici est bien une réponse à un facteur externe — l'aération insuffisante — auquel l'autre variant ne répond pas de la même façon. Il est vraisemblable que, dans les autres cas, l'apparente propension à sporuler résulte aussi d'une sensibilité particulière du variant à un facteur externe défini.

Beaucoup de travaux ont été consacrés au rôle de l'oxygène dans la sporulation, mais plutôt pour savoir s'il favorise ou empêche une sporulation produite par une cause non identifiée, que pour y chercher une cause directe de sporulation.

Ainsi, chez les anaérobies, il semble qu'en général, une faible tension d'oxygène, tant qu'elle n'inhibe pas la croissance, n'empêche pas non plus la sporulation, peut-être même la favorise parfois ; pourtant, d'une souche à l'autre les résultats peuvent être différents [15, 8, 17, 21, 2, 24].

Chez les aérobies, les auteurs reconnaissent à l'aération un effet favorable sur la sporulation [15, 5, 1, 20, 8, 25, 14]. Mais cet effet peut être indirect : l'aération accélère la croissance et hâte le moment où les aliments sont épuisés ; d'autre part, elle diminue la formation d'acides organiques et évite ou retarde l'acidification qui empêcherait la sporulation.

Certains auteurs ont établi en vase clos une tension initiale connue d'oxygène, et en ont cherché le minimum compatible avec la sporulation ; mais — remarque Knaysi, 1945 [14] — la tension, après la croissance végétative qui absorbe beaucoup d'oxygène, n'a plus sa valeur initiale, et l'on doit se méfier de minima ainsi obtenus.

Au contraire, une aération continue, soit par barbotage d'air [5, 14], soit par agitation mécanique, permet l'établissement d'un régime d'équilibre entre l'apport d'oxygène dissous et l'absorption d'oxygène respiré.

La mesure de l'aération a fait récemment l'objet de travaux précis, consécutifs aux progrès des cultures « submergées » pour la production des antibiotiques [19, 7, 23].

Nous n'avons pas cherché à mesurer ainsi l'aération dans les cultures agitées sous divers volumes ; nous avons simplement apprécié l'insuffisance de l'aération d'après la limitation apportée au taux de croissance. Depuis longtemps, le travail de Monod 1942 [18] a attiré notre attention sur l'importance de l'aération, qui devient plus aisément qu'on le pense souvent, le facteur limitant de la croissance.

Mais, comme nous avons déjà eu l'occasion de l'observer [10], il ne suffit pas de limiter le taux de croissance pour entraîner à tout coup la sporulation : limitée par une aération insuffisante, la culture du variant A ne sporule pas, et la culture du variant B ne subit qu'une sporulation partielle, qui met en évidence une hétérogénéité entre les germes.

Plus l'aération est insuffisante, plus la sporulation est partielle, et l'asphyxie de la culture ne la permet plus : c'est un nouvel argument en faveur du caractère aérobie de la sporogénèse chez un bacille aérobie strict.

CONCLUSIONS.

Entre les variants d'une même souche, ont été fréquemment décrites des différences dans l'aptitude à sporuler, dont le déterminisme pose un problème.

Dans les cas des variants A (rugueux) et B (lisse) de la souche ML de *Bacillus magatherium*, il s'agit de réponses différentes à une insuffisance de l'aération.

En effet, pour des volumes croissants de milieu synthétique dans une série de flacons agités, l'aération devient le facteur limitant de la croissance ; dans ces conditions, le variant A acidifie le milieu et ne sporule pas ; le variant B n'acidifie pas le milieu ou ne le fait que tardivement, et sporule partiellement en cours de culture.

Lorsque l'insuffisance de l'aération s'aggrave, la sporulation du variant B est de plus en plus partielle ; elle est nulle pour une asphyxie totale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. BAYNE JONES et A. PETRILLI. *J. Bact.*, 1933, **25**, 261-276.
- [2] J. BETHGE. *Zeitschr. Hyg. Infektionskr.*, 1947, **127**, 452-484.

- [3] P. BORDET. Ces *Annales*, 1930, **45**, 26-41.
- [4] J. BORDET et E. RENAUD. Ces *Annales*, 1930, **45**, 1-25.
- [5] B. C. BRUNSTETTER et C. A. MAGOON. *J. Bact.*, 1932, **24**, 85-122.
- [6] L. E. DEN DOOREN DE JONG. *Zentralbl. Bakt.*, I, 1931, **120**, 1-15.
- [7] E. L. GADEN. *Thèse Ph. D. Columbia U.*, 1949.
- [8] H. C. GREENE. *J. Bact.*, 1938, **35**, 261-270.
- [9] N. GRELET. Ces *Annales*, 1951, **81**, 430-440.
- [10] N. GRELET. Ces *Annales*, 1952, **82**, 66-77.
- [11] A. E. HAYWARD, J. A. MARCHETTA et R. S. HUTTON. *J. Bact.*, 1946, **52**, 51-54.
- [12] G. KNAYSI. *J. Bact.*, 1933, **26**, 623-644.
- [13] G. KNAYSI. *J. Bact.*, 1935, **29**, 389-390.
- [14] G. KNAYSI. *J. Bact.*, 1945, **49**, 473-493.
- [15] E. LEIFSON. *J. Bact.*, 1931, **21**, 331-356.
- [16] A. LWOFF. Communication personnelle.
- [17] A. J. MANTEUFEL. *Microbiol. (russe)*, 1940, **9**, 89-100.
- [18] J. MONOD. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann, Paris, 1942.
- [19] B. H. OLSON et M. J. JOHNSON. *J. Bact.*, 1949, **57**, 235-246.
- [20] U. PAGNINI. *G. Batt. Imm.*, 1936, **16**, 876-885.
- [21] G. RITA. *Boll. Istit. Sieroter. Milan.*, 1940, **19**, 528-531.
- [22] R. WAHL. Ces *Annales*, 1946, **72**, 473-477.
- [23] W. S. WISE. *J. gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 167-177.
- [24] E. S. WYNNE. *J. infect. Dis.*, 1948, **83**, 243-249.
- [25] A. ZIRONI et E. CARLINFANTI. *Zentralbl. Bakt.*, I, 1943, **149**, 142-153.

ÉTUDE COMPARÉE DE L'ACTIVITÉ *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE PLUSIEURS ANTIBIOTIQUES

II. — ESSAIS THÉRAPEUTIQUES ET CONCENTRATIONS SANGUINES

par P. VILLEMIN et F. BOYER.

[Institut Pasteur. Service de Chimie thérapeutique B] (*).

Dans un précédent mémoire [1], nous relations les résultats que nous avions obtenus dans le traitement de 5 septicémies expérimentales de la souris par les substances antibiotiques suivantes : pénicilline, streptomycine, néomycine, polymyxine, chloramphénicol, auréomycine et terramycine (1). Notre but est ici de déterminer :

Les variations du résultat thérapeutique en fonction de divers modes de posologie.

Les concentrations sanguines en antibiotique correspondantes.

Les rapports pouvant exister entre les concentrations humorales et les résultats thérapeutiques.

ESSAIS THÉRAPEUTIQUES

Nos essais ont été réalisés sur les septicémies expérimentales de la souris provoquées par les quatre germes suivants : *Streptococcus pyogenes*, *Diplococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella typhi*.

Les deux ou trois antibiotiques qui nous avaient donné les meilleurs résultats dans le traitement de chacune de ces septicémies ont été administrés de la façon suivante :

Pour chaque antibiotique, 6 lots de 10 souris de 18 à 25 g ont reçu la même dose totale, administrée de six façons différentes :

(*) Travail réalisé grâce à une bourse de la Fondation Waksman en France.

(1) L'étude de la polymyxine n'a pas été poursuivie ici. Les autres antibiotiques ont été utilisés sous les mêmes formes que celles qui avaient été décrites dans le précédent mémoire, à l'exception de l'auréomycine, qui, pour l'établissement des courbes de concentration sanguine, nous a été fournie sous forme de produit purifié.

Lot I. — Un seul traitement.

Lot II. — Deux traitements dans la journée (un le matin et un le soir).

Lot III. — Un traitement le matin pendant deux (a) ou trois (b) jours consécutifs.

Lot IV. — Deux traitements par jour pendant deux (a) ou trois (b) jours consécutifs.

Lot V. — Un traitement le matin pendant quatre (a) ou six (b) jours consécutifs.

Lot VI. — Deux traitements par jour pendant quatre (a) ou six (b) jours consécutifs.

Le premier traitement était administré immédiatement avant l'infection des souris qui était réalisée de la façon suivante :

D. pneumoniae et *Kl. pneumoniae*. — Chaque souris a reçu, par voie intrapéritonéale, 0,5 cm³ d'une culture à la dix-huitième heure en bouillon sérum, diluée à 10⁻⁵ dans le Tyrode.

S. pyogenes. — Même technique, sauf la culture du germe qui est faite en bouillon ascite.

S. typhi. — Chaque souris a reçu, par voie intrapéritonéale, 1 cm³ de dilution à 10⁻⁵ dans la mucine d'une culture à la dix-huitième heure en bouillon ordinaire.

Pour l'exposé des résultats (tableau I), il est possible de grouper les 6 antibiotiques étudiés en quatre groupes :

PÉNICILLINE (*Streptococcus pyogenes* et *Diplococcus pneumoniae*). — La nécessité de rapprocher les injections de pénicilline est une donnée classique (Florey et coll. [2]). Cependant plusieurs auteurs ont obtenu expérimentalement des résultats différents : White et coll. [3], traitant la streptococcie de la souris par la pénicilline X, obtiennent le même pourcentage de survies avec une même dose totale administrée en une, deux, quatre ou huit fois en vingt-quatre heures. Zubrod [4], avec la pénicilline G, assure le même nombre de survies chez des lots de souris ayant subi plusieurs traitements à intervalles de une, trois, huit ou vingt-quatre heures ; par contre, une dose unique donne de moins bons résultats. Enfin, Miller et coll. [5] trouvent les grosses doses plus efficaces dans le traitement par la pénicilline de l'infection typhoïde de la souris et concluent qu'une dose élevée de pénicilline est plus efficace que de multiples petites doses, tout au moins pour les germes peu sensibles comme *S. typhi*.

Dans nos expériences, nous retrouvons la supériorité du traitement biquotidien sur les traitements administrés en une fois par jour ; mais ceci établi, le résultat thérapeutique est le même

(a) Pour *Streptococcus pyogenes* et *Salmonella typhi*.

(b) Pour *Diplococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*.

TABLEAU I. — Résultats thérapeutiques chez la Souris.

Les doses sont exprimées en U.I./kg pour la pénicilline et en µg/kg pour les autres antibiotiques.

L'administration est faite soit par voie sous-cutanée (S-C), soit *per os* (P.O.).

Un seul traitement (lot I). — Deux traitements dans la même journée (lot II).

Un traitement (lot III) ou deux traitements (lot IV) par jour pendant 2 ou 3 jours suivant les infections.

Un traitement (lot V) ou deux traitements (lot VI) par jour pendant 4 ou 6 jours suivant les infections.

Numéro des lots traités	Dose totale administrée U.I./Kg µg/Kg	Nombre de jours de survie des témoins	Nombre de souris survivantes											
			I		II		III		IV		V		VI	
			5	10	5	10	5	10	5	10	5	10		
<i>S. pyogenes</i> (Dig. 7)														
Pénicilline s-c	10.000													
Auréomycine per os	25													
<i>D. pneumoniae</i> (Til)														
Pénicilline s-c	30.000													
Streptomycine s-c	75													
Terramycine per os	75													
<i>Kl. pneumoniae</i> (Caroli)														
Streptomycine s-c	15													
Néomycine s-c	25													
Terramycine per os	1.000													
<i>S. typhi</i> (Ty II)														
Néomycine s-c	50													
Chloramphénicol per os	750													
Auréomycine per os	375													

lorsque la même dose totale est administrée en un seul ou en plusieurs jours.

STREPTOMYCINE (*Diplococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*). **NÉOMYCINE** (*Klebsiella pneumoniae* et *S. typhi*). — Les petites doses répétées sont moins efficaces que les doses élevées et peu nombreuses ; le traitement en deux doses à huit heures d'intervalle est particulièrement efficace, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Zubrod dans le traitement par la streptomycine de l'infection de la souris à *Kl. pneumoniae* [6].

Toutefois, dans le cas de la néomycine, le traitement de la septicémie à *S. typhi* poursuivi deux ou quatre jours se révèle supérieur au traitement administré en un seul jour ; mais l'infection de la souris par ce germe qui nécessite l'emploi de mucine est très particulière et les résultats obtenus avec la néomycine sont à rapprocher de ceux que donne le chloramphénicol.

CHLORAMPHÉNICOL (*Salmonella typhi*). — Les petites doses répétées sont les plus actives. La quantité totale administrée est élevée (20 mg par souris), mais ne suffit pas à juguler l'infection lorsque la dose n'est pas répartie sur au moins trois jours.

AURÉOMYCINE (*Streptococcus pyogenes* et *S. typhi*). **TERRAMYCINE** (*Diplococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*). — Pour ces deux antibiotiques, les résultats les meilleurs sont obtenus avec la posologie intermédiaire comprenant des doses moyennes administrées pendant un temps suffisant ; cependant, une dose forte et unique d'auréomycine est très active contre *Streptococcus* et *S. typhi*. Au contraire, la terramycine donne de meilleurs résultats lorsqu'elle est administrée en deux fois dans la journée.

Nous pouvons résumer ainsi ces résultats :

L'antibiotique importe plus que le germe dans l'établissement du mode de traitement optimum des septicémies expérimentales de la souris par *Streptococcus pyogenes*, *Diplococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*. L'infection à *S. typhi* se comporte différemment et entraîne une posologie de même type, quel que soit l'antibiotique considéré.

Dans la plupart des cas, les petites doses répétées sont inefficaces, ce qui indique la nécessité d'une concentration minima d'antibiotique dans l'organisme, concentration qui, lorsqu'elle est atteinte, peut n'être maintenue qu'un temps relativement court. La pénicilline est cependant à peu près aussi active et le chloramphénicol plus actif lorsqu'ils sont administrés à petites doses répétées longtemps, ce qui les rapproche des sulfamides et des sulfones (Boyer [7]).

A dose totale équivalente, la streptomycine se révèle plus efficace lorsqu'elle est administrée en une ou deux fois que lorsqu'on l'injecte en de multiples doses répétées plusieurs jours.

CONCENTRATIONS SANGUINES EN ANTIBIOTIQUE CHEZ LES SOURIS TRAITÉES.

Nous avons établi des courbes de concentration sanguine en antibiotique correspondant à quatre types de traitement parmi ceux qui ont été décrits dans la première partie :

Lot I : administration d'une dose unique ;

Lots II, IV et VI : administration de doses biquotidiennes pendant un, deux et quatre jours ou un, trois et six jours, la dose totale demeurant équivalente.

Comme nous le verrons, l'administration des antibiotiques ne donne pas lieu à des phénomènes d'accumulation caractéristiques et les courbes des lots III et V ne diffèrent respectivement de

celles des lots II et IV que par un décalage dans le temps des diverses portions de courbe.

Les prélèvements de sang (II à III gouttes par souris) sont effectués à l'aide d'une pipette effilée au niveau du sinus rétro-orbitaire.

A chaque type de traitement correspondent 2 à 4 lots de 5 souris ; les prélèvements sont effectués successivement sur les souris de chacun de ces lots, le sang des 5 souris étant, chaque fois, recueilli dans le même tube. En procédant de cette façon, les points successifs de chaque courbe sont établis avec le mélange de sangs provenant de 5 souris différentes, ce qui permet d'obtenir des courbes très régulières. Les souris supportent très bien deux à trois prélèvements par jour pendant plusieurs jours suivantes :

TITRAGE DE LA TENEUR DES SÉRUMS EN ANTIBIOTIQUE. — Nous avons utilisé la technique de diffusion linéaire mise au point par Mitchinson et Spicer pour la streptomycine [8] et par Velu (2) et M^{me} Craipeau pour la pénicilline [9]. Les conditions de notre travail nous ont amenés à apporter les variations suivantes

Milieu. — Nous utilisons un milieu relativement pauvre : peptone (UCLAF) : 5 g ; autolysat de levure : 1 g ; glucose : 0,5 g ; ClNa : 5 g ; gélose : 10 g ; eau distillée : 1 000 cm³. Le pH est ajusté à 6,8-7 pour le titrage de la pénicilline, le chloramphénicol, l'auréomycine et la terramycine ; à 7,8-8 pour celui de la streptomycine et la néomycine.

ensemencement. — Pour le titrage de la pénicilline, la streptomycine et la néomycine : *Staphylococcus aureus* N 131 ; dilution finale à $2 \times 10^{-10^4}$ d'une culture à la vingt-quatrième heure en peptone glucosée ordinaire.

Pour le titrage du chloramphénicol : *Klebsiella pneumoniae* K 41 : dilution à 2×10^{-4} .

Pour le titrage de l'auréomycine : *Staphylococcus aureus* (souche Kling) ; dilution à 10^{-2} .

Pour le titrage de la terramycine : *B. anthracis* (souche Tigre) ; dilution à 10^{-2} .

Température. — Pour le titrage de l'auréomycine, à cause de son instabilité, les tubes sont déposés dans l'étuve à 23° C. Pour les autres antibiotiques, à 37° C.

Liquide à titrer. — Après conservation à + 4° C pendant vingt-quatre heures au maximum, les sangs prélevés sont centrifugés

(2) Nous remercions M. H. Velu qui a bien voulu nous montrer comment il appliquait cette technique de dosage et le Dr Y. Chabbert pour ses multiples conseils.

après décollement du caillot. La quantité de sérum fournie permet d'effectuer le titrage de chaque échantillon sur 3 ou 4 tubes, à condition de ne mettre dans chaque tube que 0,05 cm³ de sérum à l'aide d'un tube capillaire calibré.

Courbes étalons. — Etant donné la grande difficulté à se procurer des quantités suffisantes de sérum de souris, les courbes étalons ont été établies avec des dilutions de chaque antibiotique dans du sérum de cheval normal.

Dans ces conditions, la sensibilité de la méthode est la suivante : pénicilline, 0,15 U. I. ; streptomycine, 0,25 µg ; néomycine, 0,25 µg ; chloramphénicol, 2,5 µg ; auréomycine, 1 µg ; terramycine, 1 µg. Des quantités légèrement inférieures à celles-ci peuvent être décelées, mais non mesurées.

LES COURBES DE CONCENTRATION SANGUINE (3). — Les courbes correspondant aux trois antibiotiques administrés par voie parentérale : pénicilline (courbe 1), streptomycine (courbe 2) et néomycine (courbe 3) sont caractérisées par :

Leur régularité ;

L'absence d'accumulation des produits dans l'organisme ;

La rapidité avec laquelle la concentration atteint un niveau élevé (maximum en une demi-heure), puis diminue ;

L'élévation considérable du clocher parallèlement à la dose administrée ;

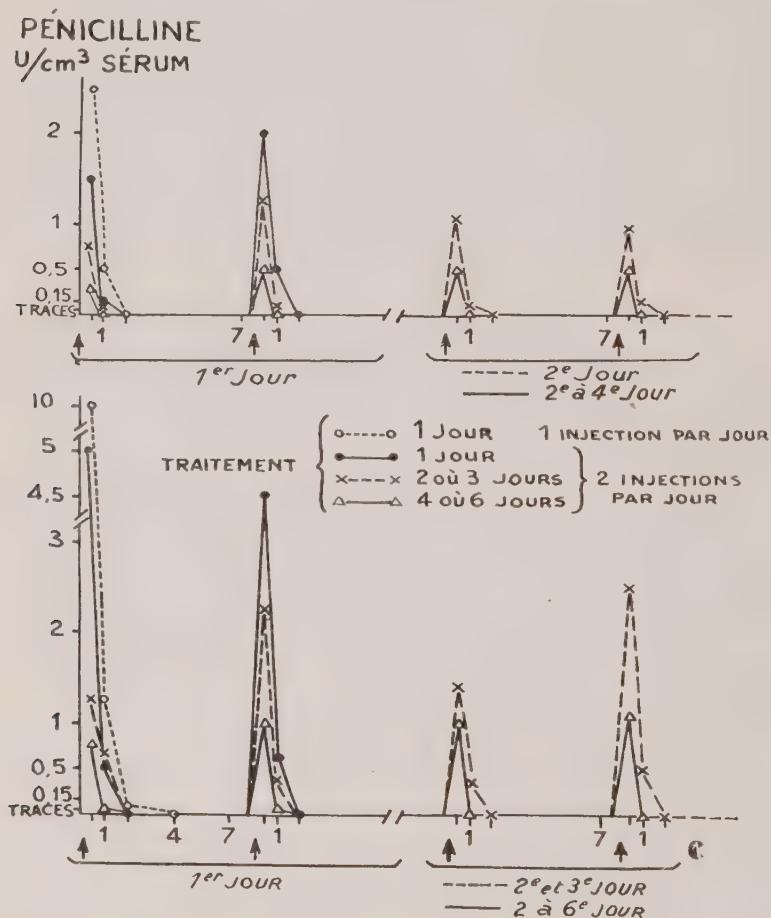
La proportionnalité à peu près constante entre les concentrations dans le sérum et les doses injectées : la quantité éliminée dans un laps de temps donné est d'autant plus forte que la concentration est plus élevée.

Au contraire, les courbes correspondant à l'auréomycine (courbe 5) et à la terramycine (courbe 6) sont moins régulières. Les concentrations atteignent des maximums moins élevés, mais diminuent plus lentement, surtout en ce qui concerne l'auréomycine : le sérum des souris ayant reçu 7,5 mg par kilogramme en contient encore des quantités notables après trente heures. La terramycine est plus rapidement éliminée ; la courbe d'élimination de cet antibiotique présente les anomalies les plus importantes correspondant sans doute à une absorption très irrégulière due à la forte dose administrée.

L'augmentation de la dose administrée entraîne une plus grande élévation du clocher avec la terramycine qu'avec l'auréomycine, comme l'ont constaté chez l'homme Welch et coll. [10].

(3) L'étalement des courbes ne nous permet pas de les reproduire dans leur totalité. Nous donnons intégralement les courbes du premier jour de traitement et la valeur moyenne des courbes obtenues les jours suivants, respectivement pour le matin et pour le soir.

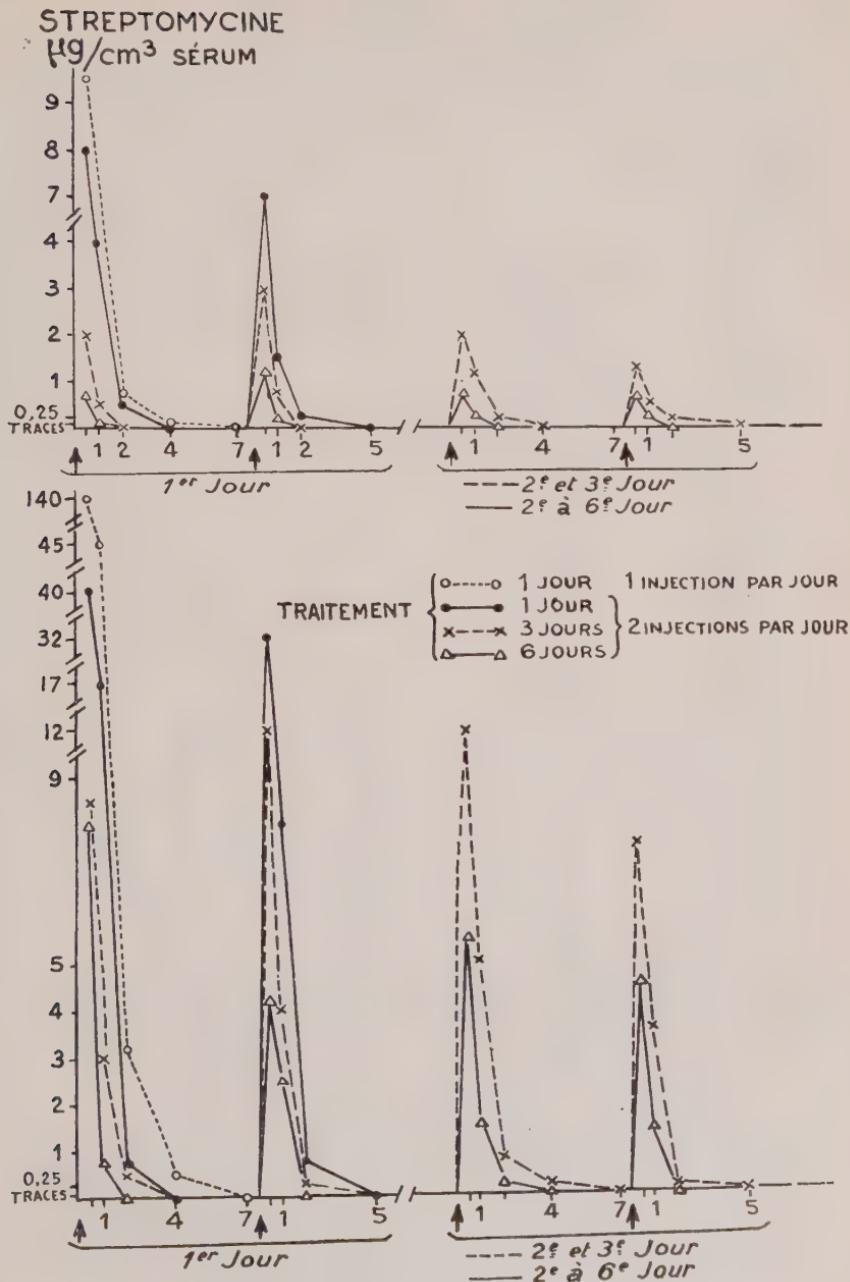
L'administration de chloramphénicol (courbe 4) fait apparaître des concentrations sanguines très élevées, comme l'on noté chez



Les flèches représentent les injections et les chiffres en abscisse indiquent les heures après la précédente injection.

Dose totale administrée à chaque souris : graphique supérieur, 10 000 U.I./kg (infection à *S. pyogenes*) ; graphique inférieur, 30 000 U.I./kg (infection à *D. pneumoniae*).

l'homme Welch [41] et Werner et coll. [42] et chez l'animal Gruhzt et coll. [43], Smith et coll. [44] et Glazko et coll. [45].

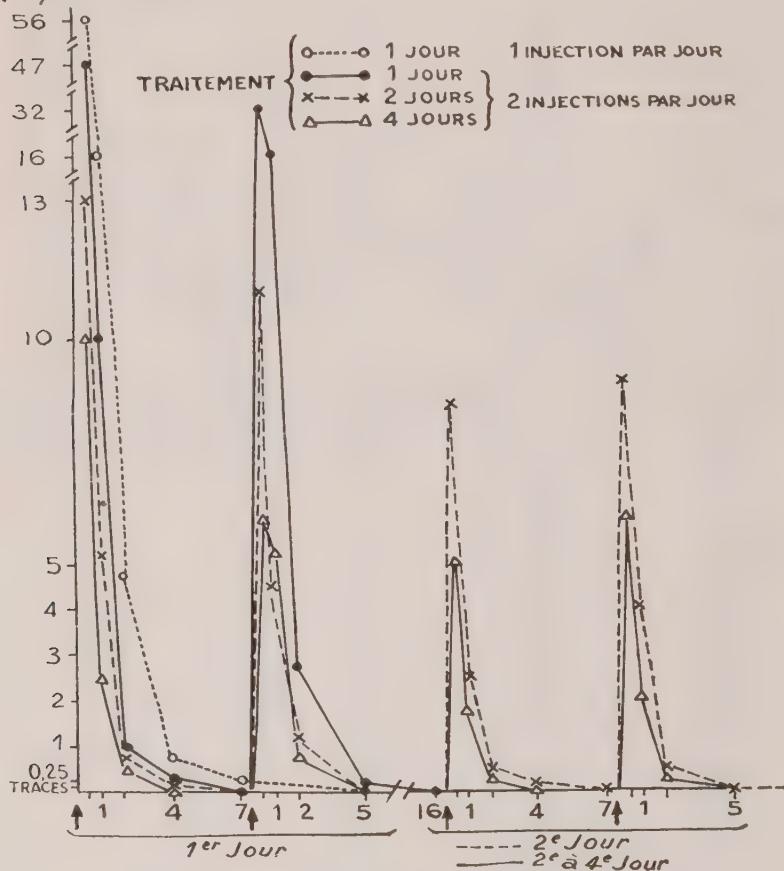


COURBE 2. — Concentrations sanguines en Streptomycine
 après administration sous-cutanée.

Les flèches représentent les injections et les chiffres en abscisse indiquent les heures après la précédente injection.
 Dose totale administrée à chaque souris : graphique supérieur, 45 mg/kg (infection à *Kl. pneumoniae*) ; graphique inférieur, 75 mg/kg (infection à *D. pneumoniae*).

Mais ces auteurs décrivent tous une élimination moins rapide

NÉOMYCINE $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ SÉRUM



COURBE 3. — Concentrations sanguines en Néomycine
après administration sous-cutanée.

Les flèches représentent les injections et les chiffres en abscisse indiquent les heures après la précédente injection.

Dose totale administrée à chaque souris, 50 mg/kg (infection à *S. typhi*).

N. B. — Les courbes correspondant à une dose totale de 25 mg/kg (infection à *Kl. pneumoniae*) sont tout à fait semblables dans leur allure générale, les maximums étant deux à trois fois élevés.

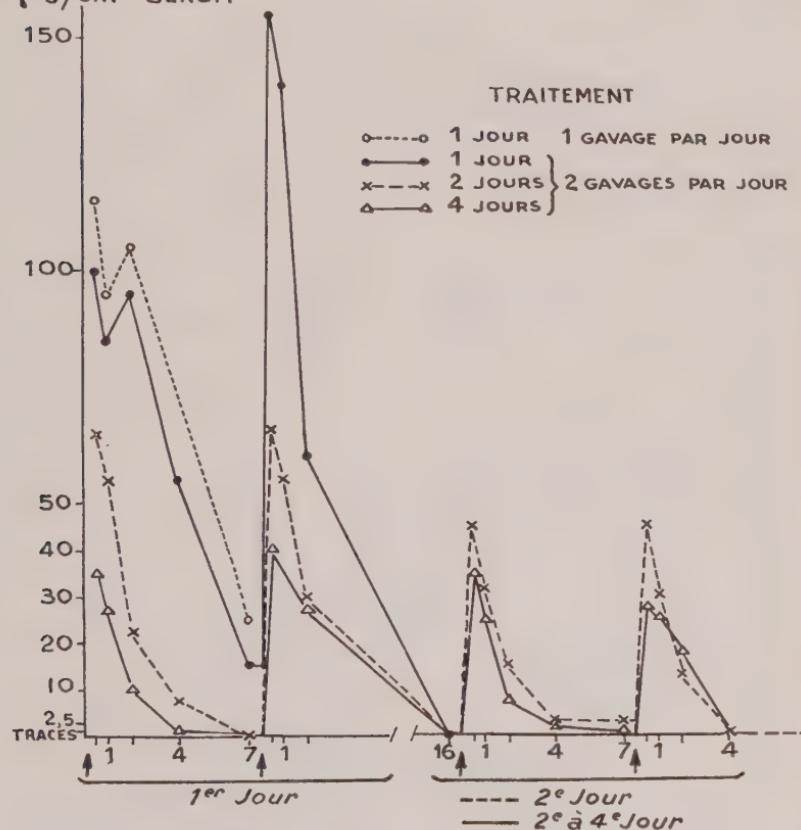
que celle que nous trouvons chez la souris. Il semble que cette remarque puisse s'appliquer à un degré plus ou moins élevé aux

6 antibiotiques dont nous relatons l'étude (Klein et coll. [20], Rake et Donovick [16]).

L'administration de ces antibiotiques ne donne lieu à aucun phénomène d'accumulation significatif.

CHLORAMPHÉNICOL

$\mu\text{g}/\text{cm}^3$ SÉRUM



COURBE 4. — Concentrations sanguines en Chloramphénicol après administration par voie buccale.

Les flèches représentent les gavages et les chiffres en abscisse indiquent les heures après le précédent gavage.

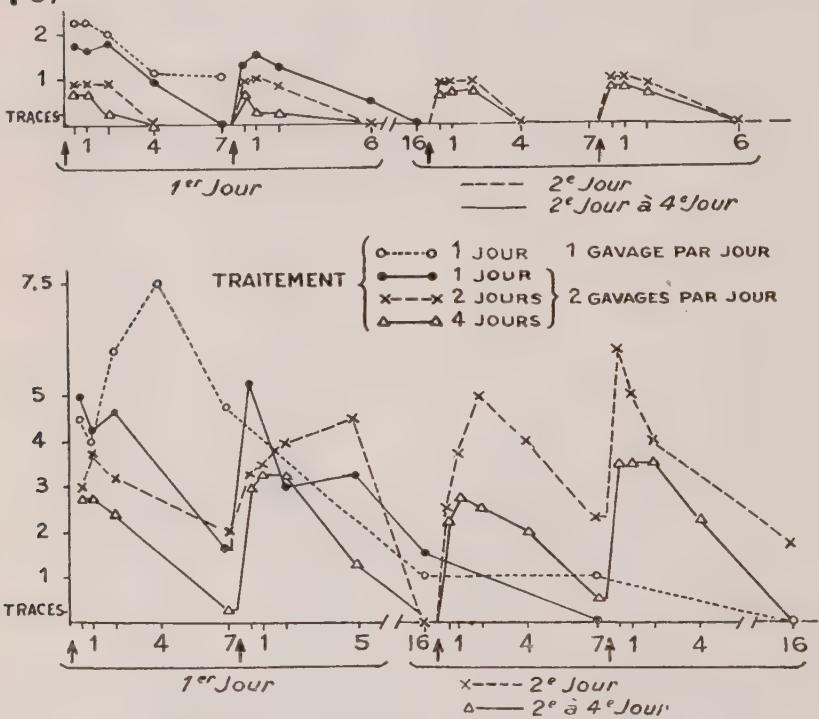
Dose totale administrée à chaque souris, 750 mg/kg (infection à *S. typhi*).

RAPPORT ENTRE EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE, CONCENTRATION SANGUINE EN ANTIBIOTIQUE ET SENSIBILITÉ *in vitro*.

Sédallian et ses coll. [17, 18] ont rapporté toute une série de traitements humains par la pénicilline où la concordance entre

les trois facteurs : taux sanguins, sensibilité *in vitro* et efficacité, était tout à fait régulière. Eagle et coll. [19] pensent qu'il faut réaliser dans le sérum des concentrations en pénicilline deux à cinq fois plus élevées que ne l'est le taux de sensibilité *in vitro*,

AURÉOMYCINE μg/cm³ SÉRUM



COURBE 5. — Concentrations sanguines en Auréomycine après administration par voie buccale.

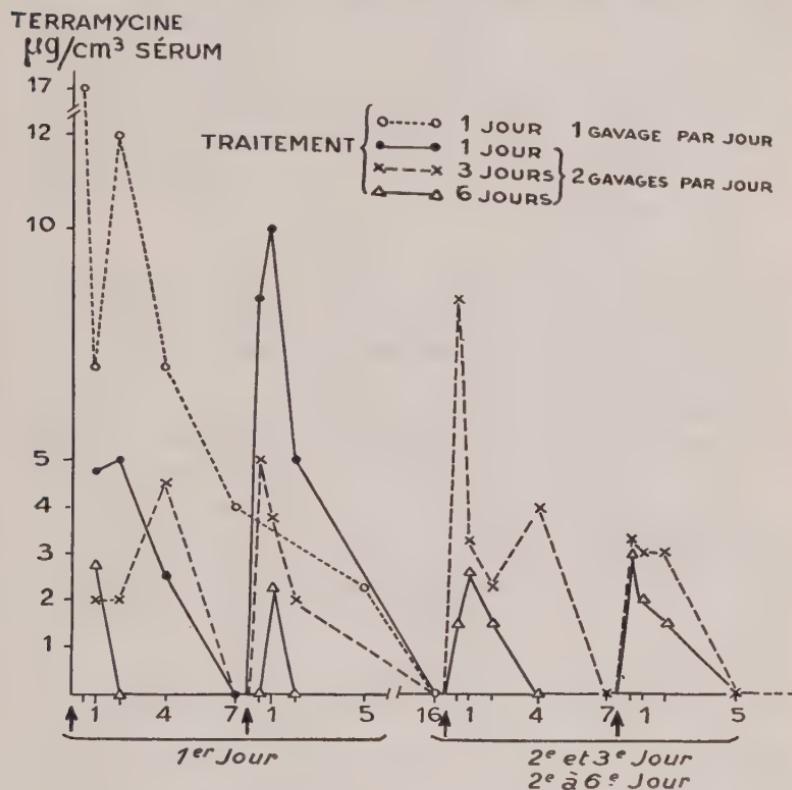
Les flèches représentent les gavages et les chiffres en abscisse indiquent les heures après le précédent gavage.

Dose totale administrée à chaque souris : graphique supérieur, 25 mg/kg (infection à *S. pyogenes*) ; graphique inférieur, 375 mg/kg (infection à *S. typhi*).

de façon à obtenir celui-ci au lieu même de l'infection. Klein et coll. [20] jugent au contraire que pour l'auréomycine, l'estimation actuelle du minimum de concentration active est trop élevée.

D'autres auteurs ont insisté sur la valeur tout à fait relative des chiffres obtenus aussi bien pour les dosages des concentra-

tions sanguines que pour la détermination des taux de sensibilité *in vitro* (Martin et coll. [21], Molitor et Graessle [22]). Ces auteurs concluent que de tels dosages ne peuvent indiquer qu'un



COURBE 6. — Concentrations sanguines en Terramycine après administration par voie buccale.

Les flèches représentent les gavages et les chiffres en abscisse indiquent les heures après le précédent gavage.

Dose totale administrée à chaque souris, 1 g/kg (infection à *Kl. pneumoniae*).

N. B. — Lorsqu'on administre à chaque souris 75 mg/kg de Terramycine en 8 gavages (lot VI du traitement de l'infection à *D. pneumoniae*), le taux sanguin demeure inférieur à la sensibilité du titrage ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Administrée en quatre ou deux fois, les taux dans le sérum varient entre 1 et $3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ pendant moins de deux heures. Avec la dose unique, le clocher atteint $4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

ordre de grandeur néanmoins précieux pour la conduite du traitement.

En thérapeutique expérimentale, il faut tenir compte de deux facteurs supplémentaires : la sévérité des infections provoquées

et le fait que l'on ne recherche pas 100 p. 100 de survies. Enfin, dans l'évaluation des taux de concentration du sérum en antibiotique, on ne tient pas compte du fait que ce dernier peut être lié aux protéines sériques ; la quantité ainsi « bloquée » peut atteindre, pour de fortes concentrations du sérum en antibiotique, 60 p. 100 pour la pénicilline (Tompsett et coll. [23]) ; 30 p. 100 pour la streptomycine (Boxer et coll. [24]) ; 70 p. 100 pour l'auréomycine (Sirota et Saltzman [25]) et 60 p. 100 pour le chloramphénicol (Smith et coll. [14]). Les chiffres fournis par les titrages ne représentent donc pas le taux d'antibiotique « libre » et actif au moment de la prise de sang, mais un taux voisin de la concentration « totale » du sérum.

Compte tenu de ces observations, nous essaierons de tirer quelques conclusions de nos expériences, après avoir donné les taux de sensibilité *in vitro* des 4 germes ayant servi à l'infection des souris dans les expériences précédemment décrites.

Taux de sensibilité des germes « in vitro ». — Ces taux ont été établis au moyen de deux méthodes différentes ; d'une part, la *méthode des dilutions* : titrage en eau peptonée glucosée ajustée à pH 7,4-7,5 et additionnée de sérum de cheval (5 p. 100) ; dilution à 10^{-4} du germeensemencé ; lecture après vingt-quatre heures de culture [1].

D'autre part, la *méthode des disques* sur plaque de gélose : disques préparés par l'Institut Pasteur ; la lecture des taux de sensibilité est faite par référence à l'inhibition provoquée sur un germe standard (*Y. Chabbert*).

Plusieurs titrages ont été effectués pour chaque germe. Les concentrations inhibitrices par centimètre cube de milieu sont

	DILUTIONS	DISQUES
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Dig. 7) :		
Pénicilline	0,008 à 0,02 4	0,02 2
Auréomycine		
<i>Diplococcus pneumoniae</i> (Til) :		
Pénicilline	0,01 à 0,04 4	0,045 5 à 8
Streptomycine		
Terramycine	0,6 à 1,1	0,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Caroli) :		
Streptomycine	1,5 à 4	1
Néomycine	3	
Terramycine	5	3
<i>Salmonella typhi</i> (Ty II) :		
Néomycine	1	
Chloramphénicol	4,5 à 6	2
Auréomycine	5 à 8,5	4 à 8

les suivantes (en U. I. pour la pénicilline et en µg pour les autres antibiotiques).

Les chiffres obtenus par les deux méthodes sont, dans l'ensemble, concordants ; de même, les résultats thérapeutiques correspondent à ceux que laissent prévoir les taux de sensibilité *in vitro*. En ce qui concerne la pénicilline, *S. pyogenes* et *D. pneumoniae* se révèlent très sensibles à cet antibiotique *in vitro*, mais beaucoup moins *in vivo* ; mais nous devons tenir compte du fait que, dans nos expériences, les injections de pénicilline sont très espacées : sa rapide élimination explique les mauvais résultats obtenus.

DISCUSSION.

PÉNICILLINE. — Les taux inhibiteurs *in vitro* vis-à-vis de *S. pyogenes* et *D. pneumoniae* sont inférieurs à la sensibilité des titrages de la concentration humorale. On peut cependant remarquer que les divers modes de posologie n'entraînent pas des variations du résultat thérapeutique correspondant aux écarts importants des maximums de concentration sanguine.

STREPTOMYCINE. — Les taux inhibiteurs *in vitro* de streptomycine sur *D. pneumoniae* ou *Kl. pneumoniae* ne sont atteints dans les humeurs que pendant un laps de temps très court, et seulement avec les plus fortes doses, seules efficaces.

NÉOMYCINE. — Le comportement de la néomycine est semblable à celui de la streptomycine en ce qui concerne le traitement de l'infection à *Kl. pneumoniae*. Par contre, les concentrations sanguines obtenues dans le traitement de l'infection de la souris par *S. typhi* sont largement supérieures dans tous les cas au taux de sensibilité *in vitro* du germe et cependant les résultats thérapeutiques ne révèlent pas une grande efficacité (3 survies sur 10 souris dans le cas le plus favorable).

CHLORAMPHÉNICAL. — Bien que les grosses doses provoquent l'apparition de concentrations sanguines élevées et maintenues longtemps au-dessus du taux bactériostatique *in vitro* sur *S. typhi*, elles sont moins efficaces que les petites doses répétées ; celles-ci assurent d'ailleurs une concentration humorale supérieure au taux inhibiteur *in vitro* pendant deux à quatre heures après chaque injection.

AURÉOMYCINE. — Les différences qui séparent les maximums de concentration en auréomycine dans le sang sont trop petites pour expliquer les différences des résultats thérapeutiques obtenus avec

les diverses posologies, surtout pour l'infection à *S. pyogenes*; la plus grande efficacité des doses élevées est vraisemblablement due à la plus longue persistance dans l'organisme des doses actives. Les taux de sensibilité des germes *in vitro* à l'auréomycine sont sujets à de très grandes variations, suivant le temps de séjour à l'étuve des tubes de titrage. Nos chiffres de lecture à la vingt-quatrième heure dépassent les taux de concentration obtenus dans le sang, ce qui est en accord avec l'opinion de Klein [20] déjà citée.

TERRAMYCINE. — Elle est éliminée plus rapidement que l'auréomycine; aussi l'administration en deux fois par jour se révèle-t-elle meilleure que la dose quotidienne unique. Seules les grosses doses provoquent l'apparition de concentrations humorales nettement supérieures aux taux de sensibilité *in vitro* de *Kl. pneumoniae* et *D. pneumoniae*; ce ne sont cependant pas les plus actives *in vivo*.

CONCLUSIONS.

1° Nous retrouvons expérimentalement les données générales établies en clinique en ce qui concerne la valeur des déterminations, faites au laboratoire, de la sensibilité des germes aux antibiotiques (Martin et coll. [21]).

2° Les concentrations sanguines en antibiotique chez les souris traitées n'atteignent jamais des taux correspondant aux taux bactéricides *in vitro*. Cependant des clochers élevés de streptomycine et de néomycine coïncident avec de bons résultats thérapeutiques, bien que l'élimination soit rapide. Au contraire, pour la pénicilline, la fréquence des injections est plus importante que leur nombre total et que la quantité totale injectée. Enfin, pour l'auréomycine et la terramycine, il est nécessaire d'obtenir un taux de concentration sanguine à la fois élevé et soutenu grâce à des doses suffisamment fortes, répétées pendant deux ou trois jours.

Les traitements des souris infectées par *S. typhi* exigent une posologie étalée sur plusieurs jours.

3° Les taux de concentration humorale en antibiotiques ne dépassent les taux inhibiteurs des germes *in vitro* que de façon presque toujours passagère (quelques heures), même lorsque le taux de survie des animaux dépasse 50 p. 100. Il faut donc admettre que les chiffres exprimant le taux de sensibilité *in vitro*, après culture de vingt-quatre heures, sont beaucoup trop élevés, ou bien qu'un contact intermittent du germe avec l'antibiotique, *in vivo*, est suffisant pour obtenir l'inhibition et permettre à la défense propre de l'organisme de jouer son rôle efficacement. La première hypothèse est vraisemblable pour l'auréomycine et la terramycine; la deuxième est d'application beaucoup plus

générale et s'est d'ailleurs révélée exacte en ce qui concerne l'action de la pénicilline sur différents germes (Eagle [26]) et de la streptomycine sur *M. tuberculosis* (Et. Bernard et B. Kreis [27]).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. VILLEMIN, F. GRUMBACH et F. BOYER. Ces Annales, 1951, **80**, 605.
- [2] H. W. FLOREY, CHAIN, HEATLEY, JENNINGS, SANDERS, ABRAHAM et FLOREY. Antibiotics. Oxford University Press, 1949.
- [3] H. J. WHITE, M. J. BAKER et E. R. JACKSON. Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med., 1948, **67**, 199.
- [4] C. G. ZUBROD. Bull. J. Hopk. Hosp., 1947, **81**, 400.
- [5] A. K. MILLER, D. L. WILNER et W. F. VERWEY. Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med., 1950, **74**, 62.
- [6] C. G. ZUBROD. Bull. J. Hopk. Hosp., 1948, **82**, 357.
- [7] F. BOYER. Etude du mode d'action de cinq sulfones hydro-solubles dérivées de la sulfone mère. Thèse Doct. ès sciences, Paris 1951.
- [8] D. A. MITCHINSON et C. C. SPICER. J. Gen. Microbiol., 1949, **3**, 184.
- [9] H. VELU et M^{me} M. CRAIPEAU. C. R. Soc. Biol., 1950, **144**, 780.
- [10] H. WELCH, F. D. HENDRICKS, C. W. PRICE et W. A. RANDALL. J. Am. Pharm. Assoc., 1950, **39**, 185.
- [11] H. WELCH. Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1951, **53**, 253.
- [12] C. A. WERNER, V. KNIGHT et W. MC DERMOTT. Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med., 1950, **74**, 261.
- [13] M. GRUHZIT, R. A. FISKEN, T. F. REUTNER et E. MARTINO. J. Clin. invest., 1949, **28**, 943.
- [14] R. M. SMITH, D. A. JOSLYN, C. M. GRUHZIT, I. W. MC LEAN, M. A. PENNER et J. EHRLICH. J. Bact., 1948, **55**, 426.
- [15] A. J. GLAZKO, L. M. WOLF, W. A. ILL et A. C. BRATTON. J. Pharm. exp. Ther., 1949, **96**, 445.
- [16] G. RAKE et R. DONOVICK, in Waksman. Streptomycin. The Williams and Wilkins Co., édit., Baltimore 1949.
- [17] et [18] P. SÉDALLIAN, R. MARAL, A. BLANDIN et G.-D. ENHAUT. Ann. Méd., 1949, **50**, 490, et La Presse Méd., 1949, **57**, 725.
- [19] H. EAGLE, R. FLEISCHMAN et D. MUSSelman. J. Bact., 1950, **59**, 625.
- [20] M. KLEIN, S. E. SHORR, S. TASHMAN et A. D. HUNT. J. Bact., 1950, **60**, 159.
- [21] R. MARTIN, Y. CHABBERT, B. SUREAU et H. MOUSSET. La Presse Méd., 1950, **58**, 865.
- [22] H. MOLITOR et O. E. GRAESSLE. J. Pharm. exp. Ther., 1950, **98**, 1.
- [23] R. TOMPSETT, S. SHULTZ et W. MC DERMOTT. J. Bact., 1947, **53**, 581.
- [24] G. E. BOXER, V. C. JELINEK et A. O. EDISON. J. Pharm. exp. Ther., 1949, **97**, 93.
- [25] J. H. SIROTA et A. SALTMAN. J. Pharm. exp. Ther., 1950, **100**, 210.
- [26] H. EAGLE. J. Clin. Invest., 1949, **28**, 821.
- [27] ET. BERNARD et B. KREIS. Ces Annales, 1951, **80**, 315.

**ALTÉRATIONS MORPHOLOGIQUES
DU BACILLE TUBERCULEUX
CONSÉCUTIVES A L'ACTION DE DIVERS MÉDICAMENTS.
ETUDE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE**

par O. RUZICZKA et E. ORTH.

(Universitäts-Kinderklinik, Wien et Institut für anorganische und analytische Chemie der Technischen Hochschule, Wien.)

Depuis l'introduction des substances douées de propriétés antibiotiques et chimiothérapeutiques dans le traitement moderne de la tuberculose, de nombreux chercheurs se sont attachés à l'étude du mode d'action de ces médicaments. Nous avons, à notre tour, tenté d'élucider ce problème et étudié les altérations morphologiques que l'on peut observer au microscope électronique après l'action de certains de ces médicaments. Les premières recherches ont été faites en 1947, avec la streptomycine. Des cultures de bacilles tuberculeux provenant de divers malades, et qui donnaient un bon développement sur le milieu à l'œuf de Hohn, ont été additionnées de solutions de streptomycine de concentrations croissantes. Au bout de huit jours, on préleve une partie de la culture avec une anse de platine, on l'émulsionne en solution physiologique et on en prend des photographies au microscope électronique. On constate alors que pour 1 µg de streptomycine par centimètre cube les bacilles sont à peine modifiés ; pour 5 µg par centimètre cube la densité de leur structure interne n'est plus tout à fait uniforme et leur délimitation est irrégulière. Avec 10 µg par centimètre cube, les altérations morphologiques sont encore plus nettes, le protoplasme et la paroi cellulaire sont presque détruits à certains endroits. Avec 100 et 1 000 µg par centimètre cube, on n'observe plus que des débris de protoplasme sans aucune structure, mais l'aspect des zones plus denses aux extrémités des bacilles n'est presque pas modifié (Martischnik et Ruziczka [1]).

Nous avons ensuite exécuté des recherches sur l'action de la 4-acétylaminobenzaldéhyde-thiosemicarbazone (Tbl, Conteben). Onensemence de façon égale un milieu de Hohn avec des bacilles tuberculeux souche H 37 RV et on dépose le Tbl au milieu de la surface ensemencée. Après sept jours d'étuve, succède à la zone d'inhibition complète du développement une zone transi-

toire présentant un début de culture, puis une culture normale. De cette zone transitoire on prélève des bacilles, on les émulsionne en eau physiologique et on les examine. On constate alors des modifications particulières de leur forme : beaucoup d'entre eux sont extrêmement petits et fins, étroits et longs ; d'autres, au contraire, larges et longs, ou bien en forme de massue. Le protoplasme reste homogène, mais de nombreuses formations sphériques, denses, apparaissent dans les bactéries, en particulier à leurs extrémités (Ruziczka et Orth [2]).

Dans le présent travail, nous avons étudié l'action de la streptomycine, de la néomycine et du para-aminosalicylate de phényle (FR7) sur les bacilles tuberculeux de la souche H 37 RV. La technique a été celle que nous venons de décrire pour le Tb1.

Les jeunes bacilles d'une culture normale de six à neuf jours sont généralement des bâtonnets droits, homogènes, nettement délimités, quelquefois légèrement coudés (pl. I, fig. 1). Chez un grand nombre d'entre eux on peut facilement reconnaître, à la partie externe, une zone bien délimitée, qui correspondrait à la capsule de cire. Les bacilles des cultures de quelques semaines à six mois n'ont plus une structure interne homogène ; ils présentent souvent des zones claires ou plus denses, ainsi que des formations ressemblant à des granulations (pl. I, fig. 2 et 3) ; la zone considérée comme correspondant à la coque de cire ne se voit plus aussi régulièrement que chez les jeunes bacilles.

Lorsque la streptomycine a exercé son action pendant huit à neuf jours, on trouve, à côté des bacilles d'aspect normal, des germes dont la structure interne est très modifiée, et d'autres qui ressemblent aux bacilles des vieilles cultures. Beaucoup sont de taille normale, d'autres sont un peu plus larges et semblent soufflés. Chez beaucoup, la capsule externe est conservée (pl. I, fig. 4 et 5) ; chez d'autres, elle n'est plus visible (pl. I, fig. 6). Les figures 2 et 4 ont été choisies parce que la distance qui existe entre les impuretés et le protoplasme permet d'apprecier la largeur de la coque.

Après une durée d'action égale de la néomycine, on trouve des germes d'aspect tout à fait normal, dont le protoplasme est à peine altéré, mais qui cependant ne présentent pas de capsule (pl. II, fig. 7), et d'autres dont la structure interne est modifiée comme dans le cas de la streptomycine. Quelques-uns ont encore une capsule externe bien visible (pl. II, fig. 8) ; chez d'autres, le protoplasme est moins nettement délimité, sans être cependant entouré d'une capsule (pl. II, fig. 9). Sur les bacilles de la figure 8, à droite, on voit nettement, entourant le protoplasme, la capsule, puis une zone complètement claire, d'environ 3 à 5 mm de large, qui s'est produite par rétraction. Il semble en être de même sur la figure 9, où le protoplasme, mal délimité

et non entouré d'une capsule, s'est rétracté et s'est séparé des impuretés à la suite de la dessiccation.

Les trois dernières photographies ont été prises après action du FR7. La figure 10 rappelle les altérations survenant dans les vieilles cultures normales, tandis que les figures 11 et 12 sont tout à fait différentes. La capsule externe est rectiligne et nettement délimitée, d'épaisseur égale ; mais le protoplasme des cellules est très modifié : il apparaît presque homogène, mais réparti cependant de façon très irrégulière, la capsule externe semblant ainsi d'une largeur inégale.

Avec tous les médicaments essayés nous avons trouvé des bacilles tuberculeux avec et sans capsule. Quand une capsule existe, elle ne semble pas être influencée par le médicament. Des altérations morphologiques importantes ne se rencontrent que dans le protoplasme des bacilles. Ceci rappelle les résultats de Cooper et coll. [3], qui ont constaté que la pénicilline radioactive agissant sur une souche sensible de *Staph. aureus* ne peut être mise en évidence que dans le cytoplasme des bactéries, et non dans la paroi cellulaire.

RÉSUMÉ.

Dans les conditions ci-dessus décrites, lorsqu'on laisse agir la streptomycine et la néomycine pendant huit à neuf jours sur le bacille tuberculeux, on observe des altérations morphologiques qui ressemblent beaucoup à celles observées dans les cultures de un à six mois à la suite du simple vieillissement. On n'a pas pu mettre en évidence de différence marquée entre l'action des deux médicaments. En revanche, les modifications produites par l'action du FR7 sont d'une tout autre nature. Il en va de même pour ce qui concerne la thiosemicarbazone. De ces altérations morphologiques diverses on peut conclure à un mode d'action différent des médicaments étudiés qui n'interviendreraient pas dans la même phase du métabolisme des bactéries. Si l'on emploie simultanément ces médicaments, on lèsera les bacilles plus facilement et plus profondément que par l'usage d'un seul d'entre eux et on facilitera à l'organisme sa défense. Nous avons effectivement obtenu, en traitant des tuberculeux de cette façon, une meilleure action des médicaments et de meilleurs résultats : l'apparition de bacilles résistants a été retardée, dans quelques cas même, empêchée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. MARTISCHNIG et O. Ruzicza. *Oesterr. Zeitschr. Kinderheilk.*, 1949, 3, 240.
- [2] O. Ruzicza et E. Orth. *Wien. med. Wochenschr.*, 1950, n° 3-4. 95.
- [3] P. D. COOPER, D. ROWLEY et J. M. DAWSON. *Nature*, 1949, 164, 842.

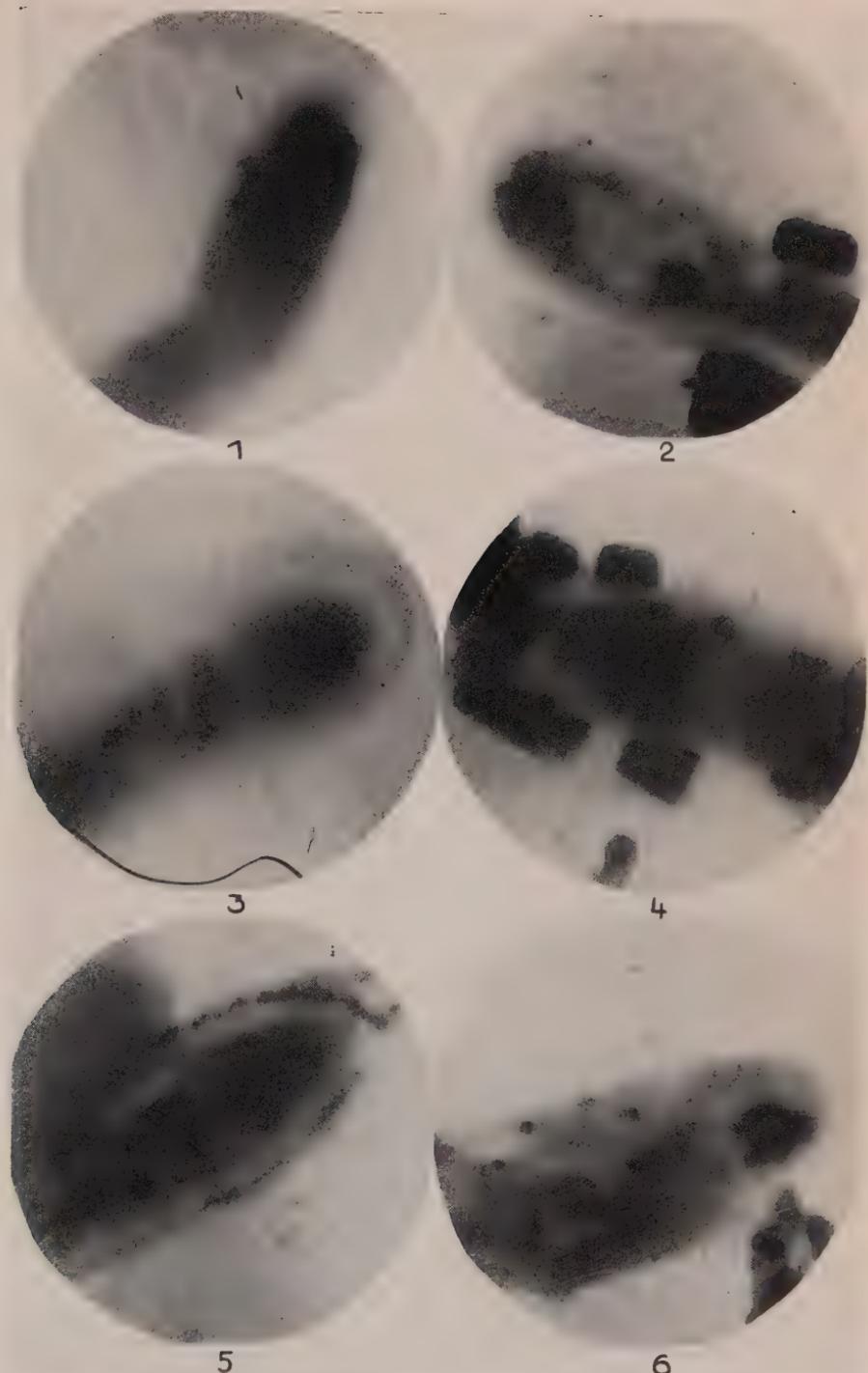


PLANCHE I.

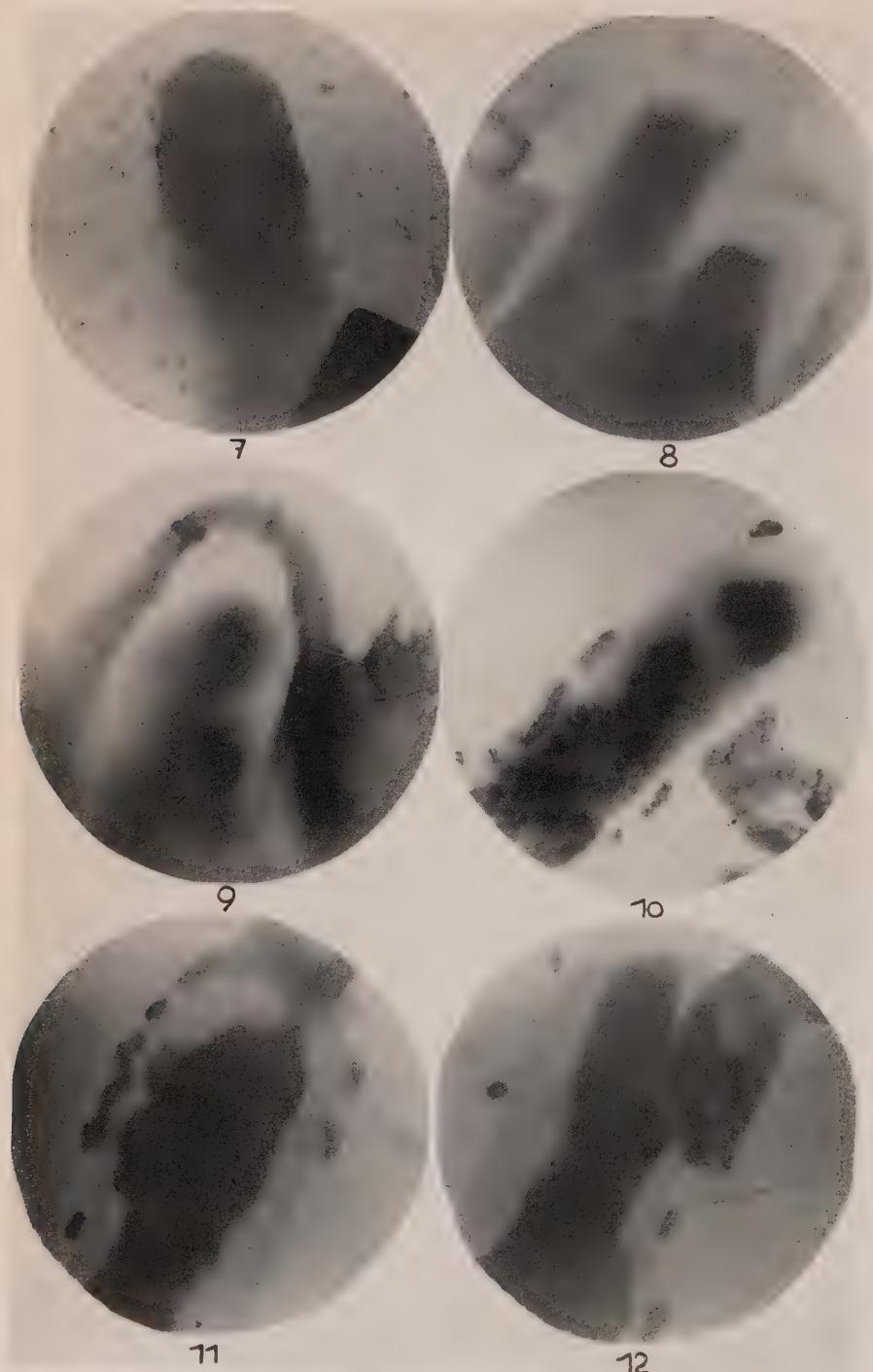


PLANCHE II.

RECHERCHES SUR LA NUTRITION DES DERMATOPHYTES

I. — ÉTUDE DES BESOINS VITAMINIQUES

par E. DROUHET et F. MARIAT (*).

(*Institut Pasteur,
Service de Mycologie et Physiologie végétale.*)

Les dermatophytes, champignons qui, dans leur vie parasitaire, se développent sur la peau et ses annexes, peuvent être cultivés sur des milieux complexes tels que les milieux de Sabouraud. Ces derniers à base de peptone, de sucres bruts et de gélose contiennent de nombreux facteurs stimulant la croissance des microorganismes [1]. Ils servent à l'identification de ces champignons pathogènes en permettant d'observer la forme caractéristique des colonies et l'aspect microscopique des organes de reproduction : macroconidies (fuseaux), microconidies et ornements du périthèce (vrilles). Quelquefois, même sur les milieux de Sabouraud, certains dermatophytes ne présentent pas les fructifications typiques. Dans un de ses importants ouvrages [2], Sabouraud faisait remarquer que « sur des milieux nutritifs mieux appropriés à leurs besoins, ces dermatophytes... fourniraient des spores latérales formées sur des hyphes fertiles ». Langeron et Milochevitch [3] ont provoqué la formation des organes caractéristiques en cultivant ces champignons sur des milieux très riches, à base de grains d'orge ou d'avoine, de crottin de cheval, de farine de blé, etc. Ces diverses observations donnèrent à penser que le développement complet de ces champignons ne se faisait qu'en présence de certains métabolites : vitamines, acides aminés, etc.

Ceci nous a conduits à entreprendre une série de travaux sur la nutrition des dermatophytes dans l'espoir de préciser : 1° leurs pouvoirs de synthèse ; 2° l'action des métabolites essentiels sur leur croissance et leur morphogénèse.

Dans ce premier mémoire nous étudions les besoins en facteurs de croissance vitaminiques des diverses souches que nous possédions au laboratoire.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 décembre 1951.

Les premiers résultats signalés à ce propos sont ceux de Mosher et coll. [4] avec *Trichophyton mentagrophytes* (*interdigitale*). Ils furent suivis d'une étude détaillée de Schopfer et Blumer [5, 6] sur les besoins en facteurs de croissance de *Trichophyton album*. Robbins et Ma [7] montrèrent les déficiences d'un *Trichophyton* très voisin, *T. discoides*. Divers auteurs [8, 9, 10, 11, 12] et, entre autres, A. de Arêa Leão et Cury [14] et tout dernièrement L. Georg [13, 15, 16] ont poursuivi l'étude de la déficience vitaminique d'un certain nombre de dermatophytes et ont montré l'existence de besoins variables.

Par l'étude des besoins de souches jusqu'ici non étudiées de ce point de vue, nous avons voulu apporter un complément d'information nouveau.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

SOUCHES ÉTUDIÉES. — 34 souches appartenant à 17 espèces ont été étudiées. Elles proviennent, soit de la collection du Service de Mycologie de l'Institut Pasteur, soit du Laboratoire du Dr Rivalier (1) à l'Hôpital Saint-Louis. Pour la dénomination des souches nous avons adopté la classification préconisée par Langeron [3] qui semble, plus que d'autres, tenir compte des caractères botaniques.

	SOUCHE	PROVENANCE
1° <i>Trichophyton acuminatum</i>	A	Hôpital Saint-Louis.
2° <i>Trichophyton acuminatum</i>	B	Hôpital Saint-Louis.
3° <i>Trichophyton concentricum</i>		Institut Pasteur.
4° <i>Trichophyton crateriforme</i>	A	Hôpital Saint-Louis.
5° <i>Trichophyton crateriforme</i>	B	Institut Pasteur.
6° <i>Trichophyton ferrugineum</i>	A	Hôpital Saint-Louis.
7° <i>Trichophyton ferrugineum</i>	B	Hôpital Saint-Louis.
8° <i>Trichophyton rosaceum</i>		Hôpital Saint-Louis.
9° <i>Trichophyton rubrum</i>	A	Institut Pasteur.
10° <i>Trichophyton rubrum</i>	B	Hôpital Saint-Louis.
11° <i>Trichophyton rubrum</i>	C	Hôpital Saint-Louis.
12° <i>Trichophyton rubrum</i>	D	Hôpital Saint-Louis.
13° <i>Trichophyton rubrum</i>	E	Hôpital Saint-Louis.
14° <i>Trichophyton sulfureum</i>		Institut Pasteur.
15° <i>Trichophyton violaceum</i>	A	Institut Pasteur.
16° <i>Trichophyton violaceum</i>	B	Institut Pasteur.
17° <i>Trichophyton violaceum</i>	C	Hôpital Saint-Louis.
18° <i>Trichophyton violaceum</i>	D	Hôpital Saint-Louis.
19° <i>Trichophyton violaceum</i>	E	R. Vanbreuseghem.
20° <i>Trichophyton glabrum</i>		Institut Pasteur.
21° <i>Trichophyton vinosum</i>		Institut Pasteur.
22° <i>Ctenomyces mentagrophytes</i>	A	Institut Pasteur.
23° <i>Ctenomyces mentagrophytes</i>	B	Hôpital Saint-Louis.
24° <i>Ctenomyces mentagrophytes</i>	C	Hôpital Saint-Louis.
25° <i>Megalosporon schönleini</i>	A	Hôpital Saint-Louis.
26° <i>Megalosporon schönleini</i>	B	Hôpital Saint-Louis.
27° <i>Megalosporon schönleini</i>	C	Hôpital Saint-Louis.

(1) Nous remercions vivement M. le Dr Rivalier, chef de laboratoire à l'Hôpital Saint-Louis, pour son extrême obligeance.

	SOUCHE	PROVENANCE
28° <i>Epidermophyton inguinale</i>	A	Institut Pasteur.
29° <i>Epidermophyton inguinale</i>	B	Hôpital Saint-Louis.
30° <i>Sabouraudites audouini</i>		Hôpital Saint-Louis.
31° <i>Sabouraudites canis</i>		Hôpital Saint-Louis.
32° <i>Sabouraudites felineum</i>	A	Institut Pasteur.
33° <i>Sabouraudites felineum</i>	B	Hôpital Saint-Louis.
34° <i>Sabouraudites gypseus</i>		Hôpital Saint-Louis.

Nous n'avons pas inclus les *Trichophyton* du groupe *faviforme*; ils ont fait l'objet de recherches détaillées, passées en revue et poursuivies par L. Georg [45, 46].

MILIEUX DE CULTURE. — Dans une première étape, les cultures ont été effectuées sur un milieu solide à base de :

SO ₄ Mg 7H ₂ O	0,5 g.
PO ₄ H ₂ K	1,5 g.
Glucosé purifié par le charbon activé	30 g.
Solution d'oligoéléments	X gouttes.
Gélose lavée	20 g.
Eau bidistillée	1 000 g.

A ce milieu s'ajoute une des sources d'azote suivantes, employées comparativement : nitrate d'ammonium, sulfate d'ammonium, asparagine, hydrolysat de caséine exempt de vitamines, mélange des acides aminés suivants : DL-alanine, β-alanine, L-arginine (base), acide DL-aspartique, L-cystéine (HCl), acide L-glutamique, glycocolle, L-histidine (HCl), DL-isoleucine, DL-leucine, L-lysine (2 HCl), DL-méthionine, DL-norleucine, DL-norvaline, L-ornithine, DL-phénylalanine, DL-proline, DL-sérine, DL-thréonine, L-tryptophane, tyrosine, DL-valine.

Chacun des milieux de base gélosés, contenant une des sources d'azote, a été additionné ou non du mélange des vitamines suivantes : thiamine (10⁻⁶) ; riboflavine (10⁻⁶) ; pyridoxine (10⁻⁶) ; vitamine B₁₂ (10⁻⁹) ; acide nicotinique (10⁻⁶) ; pantothenate de calcium (10⁻⁶) ; acide para-aminobenzoïque (10⁻⁸) ; acide folique (10⁻⁹) ; biotine (5.10⁻⁹) et inositol (10⁻⁵). Les milieux obtenus étaient donc :

- 1° Milieu de base . . + NO₃ NH₄ (0,05 p. 100).
- 2° Milieu de base . . + NO₃ NH₄ (0,05 p. 100) + vitamines.
- 3° Milieu de base . . + SO₄ (NH₄)₂ (0,1 p. 100).
- 4° Milieu de base . . + SO₄ (NH₄)₂ (0,1 p. 100) + vitamines.
- 5° Milieu de base . . + asparagine (0,1 p. 100).
- 6° Milieu de base . . + asparagine (0,1 p. 100) + vitamines.
- 7° Milieu de base . . + hydrolysat de caséine (0,2 p. 100).
- 8° Milieu de base . . + hydrolysat de caséine (0,2 p. 100) + vitamines.
- 9° Milieu de base . . + Mélange d'acides aminés purs (0,01 p. 100 pour chaque forme L et 0,02 p. 100 pour chaque forme DL).
- 10° Milieu de base . . + Mélange d'acides aminés purs (0,01 p. 100 pour chaque forme L et 0,02 p. 100 pour chaque forme DL) + vitamines.

Tous les dermatophytes expérimentés ont été ensemencés par de très petits fragments prélevés de culture sur milieu de Sabouraud ; l'apport de facteurs de croissance par l'inoculum est pratiquement nul. Quelques champignons ont été comparativement mis en culture à l'aide de spores et de fragments (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. crateriforme*, *T. acuminatum*). Les résultats ont été notés après une incubation de dix jours (fig. 1) et d'un mois (résultats définitifs) à 25°, après deux repiquages successifs sur les mêmes milieux.

RÉSULTAT DES EXPÉRIENCES.

EXPÉRIENCE I. — Mise en évidence de déficiences vitaminiques en présence de diverses sources d'azote.

Les résultats de cette expérience portant sur la croissance des champignons utilisés (résultats identiques pour toutes les souches d'une même espèce) sont résumés dans le tableau I.

TABLEAU I. — Culture de 17 dermatophytes sur un milieu dont la source d'azote varie, en présence ou en l'absence d'un mélange de vitamines (explications dans le texte).

	<input type="checkbox"/> croissance nulle ou très faible		
	<input checked="" type="checkbox"/> faible		
	<input checked="" type="checkbox"/> bonne		
		NO_3NH_4	
		id + vitamines	
		$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	
		id + vitamines	
		asparagine	
		id + vitamines	
		hydrol. caseine	
		id + vitamines	
		ac. aminés	
		id + vitamines	
Trichophyton <i>acuminatum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>crateriforme</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>sulfureum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>violaceum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>glabrum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>concentricum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>rosaceum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>vinosum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>ferrugineum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
T. <i>rubrum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Megalosporon <i>schœnleinii</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Epiderm. <i>inguinale</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Sabouraudites <i>audouini</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
S. <i>gypseus</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
S. <i>canis</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
S. <i>felineus</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Ctenom. <i>mentagrophytes</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

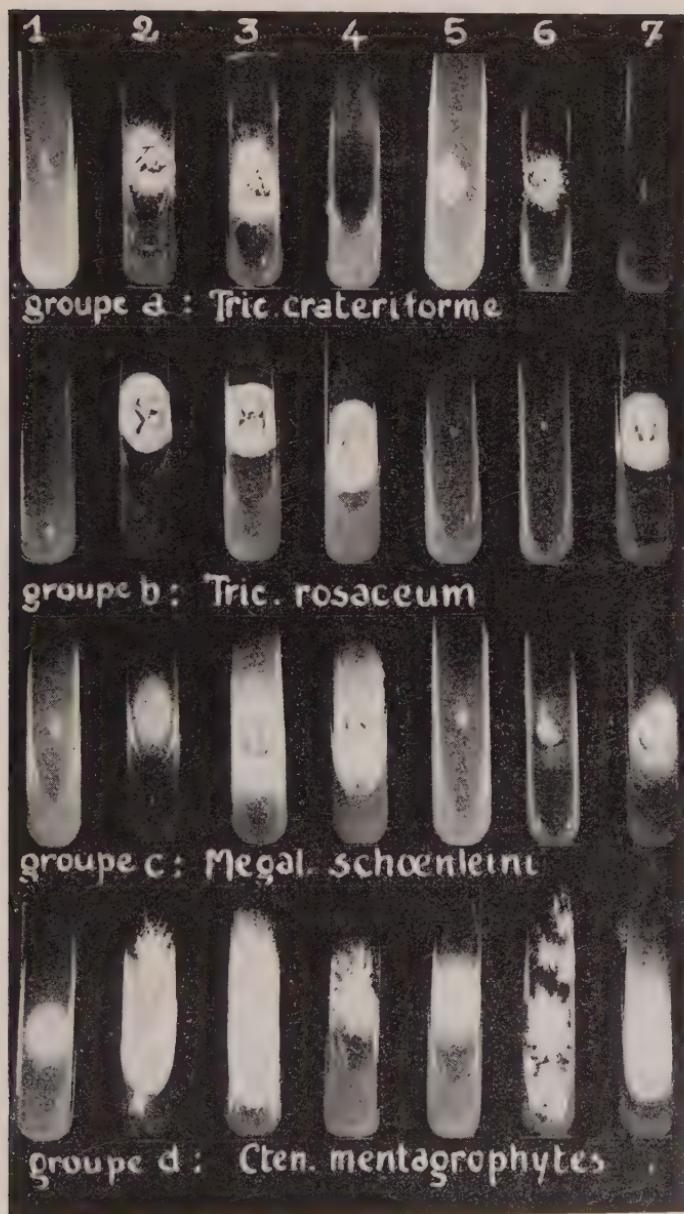


FIG. 1. — Aspects des cultures de 4 dermatophytes appartenant à des groupes différents (explications dans le texte).

1, milieu à base de sulfate d'ammonium; 5, même milieu que 1 + vitamines; 4, milieu à base d'hydrolysat de caséine; 3, même milieu que 4 + vitamines; 2, même milieu que 3 + tryptophane et cystéine; 6, milieu à base d'asparagine et de vitamines; 7, milieu à base d'acides aminés purs.

Il est possible, d'après ce tableau, de noter l'existence de quatre groupes principaux :

a) Champignons ne se développant sur aucun des milieux en l'absence de vitamines, à savoir *Trichophyton acuminatum*, *T. crateriforme*, *T. glabrum*, *T. sulfureum*, *T. violaceum* et *T. concentricum*. L'addition de vitamines permet une très bonne croissance et un aspect morphologique caractéristique des champignons sur les milieux contenant des acides aminés (hydrolysat de caséine ou acides aminés purs) et une faible croissance sur les milieux à base d'asparagine ; on note seulement un développement en profondeur de quelques filaments, avec des chlamydospores et formes de souffrance, ou même pas de développement en présence d'azote inorganique.

b) Champignons non influencés par les vitamines, mais ne se développant qu'en présence d'acides aminés : *Trichophyton roseum* et *T. vinosum*. Nous étudions, par ailleurs, les besoins en acides aminés de ces champignons.

c) Groupe comprenant des champignons (*T. ferrugineum*, *T. rubrum*, *M. schöneini*, *E. inguinale* et *S. audouini*) non influencés par les vitamines et donnant une excellente croissance et une morphologie normale en présence d'asparagine. Ici encore l'azote inorganique ne permet pas de développement.

d) Champignons non influencés par les vitamines (*S. gypseus*, *S. felineus*, *C. mentagrophytes*), donnant une très bonne croissance et un tableau morphologique complet en présence d'azote organique et, en présence d'azote minéral, seulement une faible croissance, avec ou sans ébauche d'organes de fructifications. On observe dans ce dernier cas de nombreuses formes de souffrance telles que des chlamydospores intercalaires.

EXPÉRIENCE II. — Détermination des besoins en facteurs de croissance vitaminiques des souches du groupe a.

Des cultures des seuls champignons incapables de se développer en l'absence de vitamines sont effectuées sur un milieu à base d'hydrolysat de caséine exempt de vitamine, additionné de toutes les vitamines mentionnées plus haut, moins une.

Dans ces conditions de culture, la croissance des champignons déficients en facteurs de croissance (*T. acuminatum*, *T. crateriforme*, *T. sulfureum*, *T. violaceum*, *T. glabrum*, *T. concentricum*) ne peut avoir lieu qu'en présence de thiamine (tableau II). Cette vitamine se révèle donc être leur seul facteur de croissance, c'est-à-dire qu'ils ont perdu le pouvoir d'en réaliser la synthèse. Ces mêmes organismes peuvent, en revanche, réaliser la synthèse de la thiamine, à partir de l'un de ses constituants (pyrimidine ou thiazole), comme on peut le voir dans le tableau III. La

TABLEAU II. — Tableau résumant l'expérience destinée à préciser le facteur de croissance exigé par 6 *Trichophyton* différents. Les cultures ont été effectuées sur un milieu de base à l'hydrolysat de caséine et contenant toutes les vitamines moins une.

	+ croissance bonne	+ " faible	- " nulle ou très faible	sans vitamines	+ mélange de vitamines	mélange - B1	- B2	- PP	- pantoth. Ca	- ac. pamoïo-benz.	- ac. folique	- biotine	- inositol	- B12
<i>Trichophyton acuminatum</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. crateriforme</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. sulfureum</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. violaceum</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. glabrum</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. concentricum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

culture est alors effectuée sur un milieu contenant de l'hydrolysat de caséine et toutes les vitamines citées plus haut, à l'exclusion de la thiamine, et additionné soit de thiazole (méthyl-4 hydroxy-éthyl-5 thiazole à 1.10^{-6}), soit de pyrimidine (méthyl-2 amino-méthyl-4 pyrimidine à 1.10^{-6}), soit des deux réunis. On peut remarquer, dans le tableau, que les différents champignons étudiés, hormis *T. concentricum*, ont perdu le pouvoir de synthétiser la pyrimidine qu'ils exigent pour leur croissance. *T. concentricum* semble avoir perdu en partie le pouvoir de synthétiser le thiazole et ne donne qu'une faible croissance en l'absence de ce composé.

DISCUSSION.

Sur les 34 souches de 17 espèces différentes de dermatophytes appartenant aux genres *Trichophyton*, *Megalosporon*, *Sabouraudites*, *Epidermophyton* et *Ctenomyces*, seules les espèces du genre *Trichophyton* exigent des facteurs de croissance vitaminiques ; la perte du pouvoir de synthétiser une des fractions de la molécule de thiamine est mise en évidence. Schopfer et Blumer [6], au cours de leur étude sur *Trichophyton album*, ont montré que les besoins en vitamines de cet organisme sont modifiés, selon la qualité de l'azote utilisé. En conséquence, les différentes expériences destinées à mettre en évidence les défici-

TABLEAU III. — Résultats de la culture de 6 *Trichophyton* demandant la thiamine comme facteur de croissance en présence ou en l'absence de cette vitamine ou de ses constituants. La source d'azote, contenue dans le milieu de base, est l'hydrolysat de caséine. Les 5 premiers *Trichophyton* n'exigent que la pyrimidine, *T. concentricum* est nettement stimulé par le thiazole.

	<input checked="" type="checkbox"/> croissance bonne	<input type="checkbox"/> " faible	<input type="checkbox"/> " nulle ou très faible	<input type="checkbox"/> sans aneurine	<input type="checkbox"/> avec aneurine	<input type="checkbox"/> sans B ₁ , avec thiazole + pyrimid.	<input type="checkbox"/> sans B ₁ , avec thiazole	<input type="checkbox"/> sans B ₁ , avec pyrimidine
<i>T. acuminatum</i>				<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>T. crateriforme</i>				<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>T. sulfureum</i>				<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>T. violaceum</i>				<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>T. glabrum</i>				<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>T. concentricum</i>			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

cences vitaminiques des champignons étudiés dans ce mémoire sont réalisées sur des milieux de composition définie dont on fait varier la source d'azote. L'asparagine est rarement bien utilisée par les dermatophytes (tableau I) et ceci explique l'absence de développement des champignons déficients en vitamines, même lorsque ces dernières leur sont fournies. Pourtant diverses études sur les besoins en facteurs de croissance des champignons pathogènes et des dermatophytes en particulier ont été effectuées en utilisant l'asparagine comme seule source d'azote [10, 14]. Le fait qu'au cours de l'une de ces études [14], on n'ait pu mettre en évidence de déficiences vitaminiques pour des organismes comme *T. violaceum* et *T. sulfureum* entre autres, s'explique donc par l'absence d'acides aminés dans le milieu. Ainsi s'explique également, dans ce cas, l'action stimulante de l'extrait de levure. Celui-ci apporte, en effet, à la fois l'azote aminé et la vitamine

demandée. Dans l'ensemble, d'ailleurs, les dermatophytes que nous avons étudiés, qu'ils aient ou non besoin d'un facteur de croissance vitaminique, préfèrent une source d'azote organique ou, mieux, de l'azote aminé. Les *Trichophyton* ayant perdu le pouvoir de synthétiser la thiamine (ou l'un de ses constituants) ont donc une double exigence : il faut, pour avoir une bonne croissance, leur fournir le facteur de croissance et de l'azote aminé.

Cette conjonction nous a permis d'obtenir une morphologie complète, caractéristique chez la plupart des dermatophytes déficients. Sur les milieux classiques de Sabouraud, *T. crateriforme* produit très rarement des vrilles ou des macroconidies (fuseaux). Langeron [3] décrit pour la première fois des macroconidies cylindriques obtenues en cultivant ce dermatophyte sur différents milieux naturels. Sur les milieux à base d'acides aminés et de pyrimidine, nous avons observé, en plus des hyphes sporifères fertiles, l'apparition de macroconidies cylindriques semblables à celles vues par Langeron. On note un aspect macroscopique typique en forme de cratère et la production d'un pigment jaune.

Les observations faites avec *T. sulfureum* sont comparables à celles mentionnées pour *T. crateriforme*. Les macroconidies signalées comme rares sur les milieux classiques sont nombreux sur nos milieux. On remarque également la formation d'un pigment jaune.

Avec *Trichophyton violaceum*, nous obtenons les mêmes résultats que L. Georg [18, 19], quant aux besoins vitaminiques. Les microconidies, rarement observées sur les milieux de Sabouraud, sont nombreuses sur nos milieux. Toutefois, nous n'avons pas constaté l'apparition des macroconidies que Georg a obtenues en présence de concentrations de thiamine plus fortes que celles que nous employons. Une souche pléomorphisée de ce champignon montre les mêmes besoins en facteurs de croissance que la forme normale, la vitesse de croissance étant plus lente pour celle-ci que pour celle-là. Sur un milieu à base d'hydrolysat de caséine et du mélange de vitamines, la suppression de l'acide para-aminobenzoïque, de la biotine ou du pantothéate de calcium favorise la formation de secteurs pléomorphisés de la souche normale de *T. violaceum*. *T. glabrum*, considéré par Sabouraud comme une variété fixe non pigmentée de *T. violaceum*, présente les mêmes besoins en pyrimidine que ce dernier ; ceci confirme les observations de Georg.

T. concentricum fait preuve d'une très faible croissance sur les milieux minéraux en l'absence de vitamines ; sur les milieux à base d'azote aminé sans vitamine, la croissance est légèrement supérieure ; elle est nettement stimulée par la fraction

thiazole de la thiamine. Il est probable qu'en présence d'azote aminé, ce facteur est partiellement synthétisé, mais en quantité insuffisante pour permettre la croissance abondante que l'on observe à la suite d'un apport exogène de thiazole. Il est à remarquer que le nombre des champignons exigeant le thiazole comme seul facteur de croissance est probablement extrêmement réduit, il n'en existe à notre connaissance qu'un seul, le *Mucor ramannianus* [17]. La perte partielle du pouvoir de synthétiser le thiazole par *T. concentricum* était donc à souligner. La culture de *T. concentricum* sur milieu à base d'hydrolysat de caséine et de vitamines donne naissance à des colonies plus grandes, moins plissées et plus riches en spores que les colonies obtenues sur gélose de Sabouraud.

RÉSUMÉ.

Les déficiences en facteurs de croissance vitaminiques de 34 souches appartenant à 17 espèces différentes de dermatophytes ont été étudiées sur des milieux dont la source d'azote était soit inorganique (nitrate ou sulfate d'ammonium), soit organique (asparagine, hydrolysat de caséine ou acides aminés purs). Les souches incapables de se développer en l'absence de vitamines sont : *Trichophyton acuminatum*, *T. crateriforme*, *T. sulfureum*, *T. violaceum* et *T. glabrum*. Ces souches demandent, comme facteurs de croissance, la fraction pyrimidine de la thiamine. En présence de pyrimidine sur milieu à base d'acides aminés, ces souches montrent les organes caractéristiques de fructification. *Trichophyton concentricum* qui, sans vitamines en présence d'azote aminé, fait preuve d'une faible croissance, est stimulé par la fraction thiazole de la vitamine B₁.

L'azote organique, en particulier l'azote aminé, est nécessaire pour obtenir une bonne croissance des dermatophytes étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. H. SCHOPFER. Plants and vitamins. Chronica Botanica, édit., Waltham, 1949.
- [2] R. SABOURAUD. Les teignes. Masson et Cie, édit., Paris, 1910.
- [3] M. LANGERON et S. MILOCHEVITCH. Ann. Parasit., 1930, **8**, 465.
- [4] W. MOSHER et coll. Plant Physiol., 1936, **11**, 795.
- [5] W. H. SCHOPFER et S. BLUMER. C. R. Soc. Phys. Hist. nat. Genève, 1942, **59**, 106.
- [6] W. H. SCHOPFER et S. BLUMER. Ber. Schweiz. Bot. Gesell., 1943, **53**, 409.
- [7] W. J. ROBBINS, J. E. MACKINNON et R. MA. Bull. Torrey Bot. Club, 1942, **69**, 509.
- [8] T. OYAMA. Nagasaki Igakkai Zasshi, 1937, **15**, 2061.
- [9] W. J. ROBBINS et V. KAVANAGH. Bot. Rev., 1942, **8**, 411.

- [40] P. R. BURKHOLDER et D. MOYER. *Bull. Torrey Bot. Club*, 1943, **70**, 372.
- [41] J. E. MACKINNON et R. C. A.-ALLÈNDE. *J. Bact.*, 1948, **56**, 91.
- [42] W. J. ROBBINS. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1950, **50**, 1357.
- [43] L. GEORG. *Trans. New York Acad. Sci.*, 1949, **11**, 281.
- [44] A. E. DE AREA LEAO et A. CURY. *Mycopath. et Mycol. appl.*, 1950, **5**, 65.
- [45] L. GEORG. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1950, **50**, 1315.
- [46] L. GEORG. *Mycologia*, 1950, **42**, 683.
- [47] W. F. MÜLLER et W. H. SCHOPFER. *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **205**, 687.
- [48] L. GEORG. *Mycologia*, 1951, **43**, 297.
- [49] L. GEORG. *Mycologia*, 1951, **43**, 536.

RECHERCHES SUR LA NUTRITION DES DERMATOPHYTES

II. — ACTION DES ACIDES AMINÉS SUR LA CROISSANCE ET LA MORPHOGÉNÈSE

par E. DROUHET (*).

(Institut Pasteur, Service de Mycologie et Physiologie végétale.)

Dans le mémoire précédent [1] nous avons rapporté que, dans l'ensemble, les souches de dermatophytes demandent, pour donner une bonne croissance et une morphologie caractéristique, une source d'azote organique. Parmi eux, certains ne se développent qu'en présence d'hydrolysat de caséine ou d'un mélange d'acides aminés purs.

Afin d'étudier et de préciser l'influence de chaque acide aminé sur la croissance et la morphogénèse de ces dermatophytes, nous les avons cultivés sur un milieu synthétique dont la source d'azote était représentée par un seul acide aminé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les souches utilisées ont la même origine que celles mentionnées précédemment. Ce sont :

Trichophyton roseum.
Trichophyton rubrum, souche B.
Trichophyton acuminatum, souche A.
Trichophyton concentricum.
Trichophyton crateriforme.
Trichophyton sulfureum.
Sabouraudites gypseus.
Sabouraudites audouini.
Sabouraudites felineus, souche B.
Clenomyces mentagrophytes, souches B et C.
Epidermophyton inguinale, souche A.
Megalosporon Schönléini, souches A et B.

La composition du milieu de culture de base est la suivante :

SO ₄ Mg 7H ₂ O	0,5 g
PO ₄ H ₂ K	1,5 g
Glucose purifié	30 g
Solution d'oligoéléments.	X gouttes.
Gélose lavée.	20 g
Eau bidistillée.	1 000 g

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 décembre 1951.

A ce milieu on ajoute un mélange de vitamines (thiamine 10^{-6} ; riboflavine 10^{-6} ; pyridoxine 10^{-6} ; vitamine B₁₂ 10^{-9} ; acide nicotinique 10^{-6} ; pantothenate de Ca 10^{-6} ; acide *p*.amino-benzoïque 10^{-8} ; acide folique 10^{-9} ; biotine 5.10^{-9} ; inositol 10^{-5}) pour les champignons dont nous avons montré précédemment la déficience vitaminique, à savoir : *T. acuminatum*, *T. crateriforme*, *T. sulfureum*, *T. concentricum*.

La source d'azote est un des acides aminés de la liste ci-après à la concentration de 0,5 g/l pour les formes L et 1 g/l pour les formes DL :

DL-alanine ; β -alanine ; L-arginine (base) ; acide DL-aspartique ; L-cystéine (HCl) ; acide L-glutamique ; glycocolle ; L-histidine (HCl) ; DL-leucine; L-lysine (2 HCl) ; DL-méthionine ; DL-norleucine ; DL-norvaline ; L-ornithine ; DL-oxyproline ; DL-phénylalanine ; DL-proline ; DL-sérine ; DL-thréonine ; L-tryptophane ; tyrosine ; DL-valine.

Des cultures comparatives sont faites, utilisant comme sources d'azote : NO_3NH_4 , 0,05 p. 100 ; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0,1 p. 100 ; asparagine, 0,1 p. 100 ; urée, 0,1 p. 100 ; hydrolysat de caséine, 0,2 p. 100.

Les dimensions des colonies sont mesurées après deux semaines, un mois et trois mois. Les résultats mentionnés dans les tableaux sont obtenus après le deuxième repiquage sur le même milieu pour des cultures gardées un mois à l'étuve à 25°. Les observations morphologiques sont faites après ce même délai.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES.

Sur les 12 espèces de dermatophytes expérimentés, seul *Trichophyton rosaceum* exige un acide aminé déterminé, l'histidine. En présence de lysine, il donne toutefois une faible croissance. On ne constate pas de développement de ce champignon si on le cultive en présence d'un acide aminé autre que l'histidine ou la lysine, ou en présence d'un mélange d'acides aminés, dont on a exclu ces composés. Les autres sources d'azote organique ou minéral sont incapables de provoquer la croissance.

Les dermatophytes autres que *T. rosaceum* ne demandent pas un acide aminé bien déterminé ; suivant les souches, ils sont capables d'utiliser divers acides aminés. Dans l'ensemble, ces champignons utilisent les acides aminés dans l'ordre préférentiel suivant : arginine et proline (utilisés par tous les champignons) > acide glutamique > sérine > glycocolle > alanine > β -alanine, valine > leucine > phénylalanine > acide aspartique > tyrosine > histidine, isoleucine > thréonine > norleucine. L'ornithine, la norvaline, la méthionine et la lysine ne sont uti-

lisées que par peu de champignons qui, en leur présence, donnent une faible croissance. La cystéine, le tryptophane et l'oxyproline ne sont utilisés par aucun champignon (voir tableau I).

Les colonies de *Sabouraudites gypseus* cultivées sur milieu glucosé de Sabouraud présentent un aspect poudreux, d'abord blanc, puis devenant par la suite de couleur café au lait. Un duvet blanc secondaire se forme par endroits. Au microscope, l'aspect correspondant au caractère « poudreux » est donné par des macroconidies sous forme de fuseaux à nombreuses logettes, mycélium en raquettes, appareil conidien de type *acladium* avec des microconidies piriformes et des vrilles. On obtient cet aspect caractéristique lorsque l'on cultive *Sabouraudites gypseus* sur un milieu synthétique en présence d'un des acides aminés le mieux utilisés : arginine, glycocolle, phénylalanine, proline, sérine, tyrosine, valine. On peut noter, en plus, en présence de certains acides aminés comme l'histidine, l'acide glutamique, l'alanine, la formation de nombreuses chlamydospores. Avec des acides aminés peu utilisés (méthionine, norleucine, thréonine, tryptophane) ou une source d'azote minéral, on constate un développement en profondeur, accompagné de la formation d'hypes mycéliennes stériles et de chlamydospores intercalaires. On peut, par le tableau II, se faire une idée de la fréquence des divers éléments microscopiques en présence des divers acides aminés. L'aspect microscopique de *S. felineus* est caractérisé par un appareil conidien formé de nombreux fuseaux et de filaments fertiles du type *acladium*. On note également la présence de chlamydospores. La couleur du pigment formé par ce champignon varie suivant l'acide aminé fourni par le milieu de culture (tableau II).

S. audouini se présente en culture sous forme de colonies recouvertes d'un duvet court et serré. La face inférieure de la colonie est légèrement pigmentée lorsque la culture est faite en présence d'arginine, de glycocolle, de phénylalanine ou de tyrosine. L'aspect microscopique est en général donné par un mycélium polymorphe avec des chlamydospores intercalaires ou terminales et des aleuries à pied court. En présence des acides aminés permettant une bonne croissance, ainsi que sur le milieu de Sabouraud, cette souche de *S. audouini* n'a donné que des ébauches de fuseaux. Il existe probablement un facteur indéterminé capable d'amener la formation de fuseaux.

Les autres champignons présentent un aspect morphologique caractéristique, partout où on obtient une bonne croissance. Cet aspect est comparable à celui que l'on obtient avec l'hydrolysat de caséine et que nous avons mentionné au cours d'un précédent mémoire. Là où la croissance est faible, on n'observe que tardivement de très rares organes de fructification.

TABLEAU I. — Tableau résumant la croissance de 12 dermatophytes en présence de diverses sources d'azote.

	croissance bonne	croissance faible	croissance nulle ou très faible
Trichophyton <i>rassaeum</i>	□	■	□
<i>T. rubrum</i>	□	■	□
<i>T. acuminatum</i>	□	■	□
<i>T. concentricum</i>	□	■	□
<i>T. crateriforme</i>	□	■	□
<i>T. sulfureum</i>	□	■	□
Sabouraudites <i>Gypseus</i>	□	■	□
<i>S. audouinii</i>	□	■	□
<i>S. felineus</i>	□	■	□
Ctenomyces <i>mentagrophytes</i>	□	■	□
Epidemophyton <i>inguinale</i>	□	■	□
Megaloporon <i>schoenleinii</i>	□	■	□

TABLEAU II. — Tableau résumant l'action sur la croissance et la morphogénèse de divers acides aminés et autres composés azotés.

Croissance : 0 nulle, ± très faible; + faible, ++ bonne; pigment : 0 absent, ± très peu, + peu, ++ abondant; macro-, microconidies, chlamydospores : 0 absentes, ± rares, + nombreuses, ++ très nombreuses.

Sources d'azote	SABOURAUDITES GYPSEUS						SABOURAUDITES FELINEUS					
	croissance	pigment	aspect macroscopique	macroconidies	microconidies	Chlamydospores	croissance	pigment	macroconidies	microconidies	chlamydospores	
DL-alanine	++	+	duvet second. poudreux	+	+	+	++	++ orangé	++	++	++	
β-alanine	++	±	----id----	+	+	+	+	+ jaune	++	++	+	
L-arginine	++	++	poudreux, peu de duvet sec.	++	++	0	++	+ jaune	++	++	+	
DL-aspartique	++	++	duveteux	++	++	+	++	++ jaune	++	++	+	
L-cystéine	0	0	0	0	0	0	±	0	+	+	+	
ac.L-glutamique	++	++	poudreux duvet second.	++	++	++	+	++ orangé	+	+	++	
glycocolle	++	++	----id----	++	++	0	++	++ orangé	+	++	+	
L-histidine	++	+	----id----	+	+	++	++	++ rose	+	++	+	
DL-isoleucine	+	±	duveteux, cult. profonde	±	+	++	+	± jaune	0	±	++	
DL-leucine	+	±	----id----	±	+	++	+	± jaune	0	±	++	
L-lysine	±	0	culture en profondeur	0	0	++	±	0	0	0	0	+
DL-méthionine	±	0	duveteux cult.profonde	0	0	++	±	0	0	0	0	+
DL-norleucine	+	0	duveteux	0	+	++	++	+	±	+	++	
DL-norvaline	+	0	----id----	0	+	++	+	0	0	0	+	++
L-ornithine	+	+	duvet brun cult.profonde	±	+	++	+	± jaune	0	+	++	
DL-phénylalanine	++	+	poudreux	++	++	±	+	+	±	+	++	
DL-proline	++	+	poudreux duvet.second.	++	++	±	+	0	+	+	++	
DL-sérine	++	+	duveteux	++	++	±	++	+	+	+	++	
DL-thréonine	±	0	duveteux cult.profonde	0	0	++	+	0	0	0	0	++
L-tryptophane	±	±	----id----	0	0	++	±	0	0	0	0	++
tyrosine	++	+	poudreux peu de duvet	++	++	+	++	++ rose	++	++	+	
DL-valine	++	+	----id----	++	++	+	++	0	+	+	+	
NO_3NH_4	±	0	duveteux cult.profonde	0	0	+	+	0	±	+	++	
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	±	0	----id----	0	0	+	+	0	±	+	++	
asparagine	++	+	duveteux	++	++	+	++	++ jaune	++	++	+	
urée	++	+	poudreux duvet.second.	++	++	+	+	+	+	+	+	

DISCUSSION.

Nickerson et Williams [2] remarquent, en 1947, le peu d'information existant sur les besoins azotés spécifiques des dermatophytes. Une des premières études est celle de Mosher et coll. [3] sur *Trichophyton mentagrophytes (interdigitale)* où il est montré que ce champignon exige de l'azote aminé. Schopfer et Blumer [4, 5] étudient pour la première fois la physiologie d'un dermatophyte, *T. album*, sur un milieu synthétique rigoureusement contrôlé. Ils remarquent que la synthèse de diverses vitamines par ce champignon varie selon la source d'azote utilisée. Au cours de la même année paraît l'intéressante étude de Robbins et coll. [6] sur *T. discoides* et, ultérieurement, une autre sur *T. mentagrophytes* [7]. La forme normale conidienne de ce dernier dermatophyte n'utilise que l'azote organique, mais ne requiert pas spécifiquement un acide aminé. La forme pléomorphisée (mycélienne) peut, en revanche, utiliser l'azote inorganique. L'étude de Robbins et coll. a été reprise et confirmée récemment par Mc Veigh et Campbell [8] avec plusieurs souches de *T. mentagrophytes*. Les acides aminés le mieux utilisés par ce champignon sont, d'après ces auteurs, l'acide glutamique > l'arginine \geq la tyrosine > la leucine. La croissance obtenue en présence d'un seul acide aminé n'atteint pas celle que l'on obtient en présence d'un mélange d'acides aminés comme celui qui figure dans l'hydrolysat de caséine. Au cours d'un récent travail, Archibald et Reiss [9] montrent que la majorité des acides aminés peut être utilisée par la plupart des dermatophytes qu'ils étudient (*Microsporum audouini*, *M. lanosum*, *M. fulvum*, *Trichophyton purpureum*, *T. gypseus*, *Epidermophyton inguinale* et *Achorion Schönleinii*). Ces auteurs, qui ne donnent pas de détail sur l'aspect microscopique de leurs cultures, remarquent une croissance en profondeur inversement proportionnelle à l'utilisation de l'acide aminé.

Nous avons vu que seul *T. rosaceum* exige un seul acide aminé, l'histidine, pour faire preuve d'une bonne croissance. C'est le second cas, à notre connaissance, où un dermatophyte présente une exigence aussi déterminée ; le premier cas ayant été récemment décrit au cours de l'étude très complète de Georg [10]. Parmi les 11 souches de *Trichophyton violaceum* étudiées par Georg, une seule, qui se montre d'ailleurs morphologiquement distincte, exige un acide aminé déterminé, l'histidine. Il semble qu'on puisse rapprocher notre souche de celle de Georg ; d'ailleurs l'aspect photographique de la souche de *T. violaceum* n° 365 de cet auteur ressemble beaucoup à celui de *T. rosaceum*.

Nos résultats, quant à l'utilisation des acides aminés par les

autres dermatophytes, peuvent, dans l'ensemble, être rapprochés de ceux qui ont été obtenus avec des champignons très différents, tels que *Aspergillus niger* [11] ou *Saccharomyces* [12]. L'utilisation de chaque acide aminé varie suivant les espèces cultivées. Les acides aminés soufrés ne sont pas utilisés. Il en est de même de l'oxyproline ; rappelons à ce sujet l'inhibition de la croissance de *T. mentagrophytes* que Robbins et coll. avaient constatée avec l'hydroxyproline, même en présence d'une autre source d'azote.

En conclusion, tandis que l'azote inorganique n'est pratiquement pas utilisé par *Trichophyton*, *Epidermophyton* et seulement faiblement utilisé par *Sabouraudites* et *Ctenomyces*, certains acides aminés constituent une bonne source d'azote permettant un développement caractéristique avec macro- et micro-conidies. Il suffit pour cela que le milieu synthétique de base convienne, c'est-à-dire, par exemple, qu'il contienne les vitamines que certains dermatophytes sont incapables de synthétiser. Il est à remarquer qu'en présence d'un seul acide aminé, ces dermatophytes se développent plus lentement qu'en présence d'un mélange de ces composés, surtout sous la forme de l'hydrolysat de caséine ; bien que purifié, ce dernier ne contient probablement pas que de l'azote aminé. En présence d'un seul acide aminé, la période de latence est très longue, elle est plus courte après un second repiquage sur un milieu identique ; il semble y avoir une adaptation de l'organisme à l'acide aminé fourni.

RÉSUMÉ.

1^o Sur les 12 espèces de dermatophytes expérimentés, seul *T. rosaceum* exige un acide aminé déterminé, l'histidine. En présence de lysine, il donne toutefois une faible croissance.

2^o Les champignons expérimentés, autres que *T. rosaceum*, n'exigent pas un acide aminé déterminé. L'azote aminé leur permet de réaliser un développement caractéristique. Dans l'ensemble, ces champignons utilisent les acides aminés dans l'ordre préférentiel suivant : arginine et proline > acide glutamique > sérine > glycocolle > alanine > valine > leucine > phénylalanine > acide aspartique > tyrosine > histidine, isoleucine > thréonine > norleucine. Les acides aminés soufrés et le tryptophane ne sont pratiquement pas utilisés.

3^o En présence d'un seul acide aminé, ces champignons se développent beaucoup plus lentement que lorsqu'un mélange de ces composés leur est fourni

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. DROUHET et F. MARIAT. *Ces Annales*, 1952, **82**, 337.
- [2] W. J. NICKERSON et J. W. WILLIAMS. In W. J. NICKERSON : Biology of pathogenic fungi. *Chronica botanica*, édit., Waltham, 1947.
- [3] W. MOSHER et coll. *Plant Physiol.*, 1936, **11**, 795.
- [4] W. H. SCHOPFER et S. BLUMER. *C. R. Soc. Phys. Hist. Nat. Gen.*, 1942, **59**, 106.
- [5] W. H. SCHOPFER et S. BLUMER. *Ber. Schweiz. Bot. Gesell.*, 1943, **53**, 403.
- [6] W. J. ROBBINS, J. E. MACKINNON et R. MA. *Bull. Torrey Bot. Club*, 1943, **70**, 372.
- [7] W. J. ROBBINS et R. MA. *Am. J. Bot.*, 1945, **32**, 509.
- [8] I. MC VEIGH et F. CAMPBELL. *Mycologia*, 1950, **42**, 451.
- [9] R. M. ARCHIBALD et F. REISS. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1950, **50**, 1388.
- [10] L. K. GEORG. *Mycologia*, 1951, **43**, 297 et 536.
- [11] R. A. STEINBERG. *J. Agric. Res.*, 1942, **64**, 455.
- [12] A. S. SCHULTZ et S. POMPER. *Arch. Biochem.*, 1948, **19**, 184.

ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE DE QUELQUES BACTÉRIES ANAÉROBIES

par RENÉE SAISSAC, J. M. BRUGIÉRE et M. RAYNAUD.

(Institut Pasteur [Annexe de Garches].
Service des Anaérobies.)

Il semble bien que les agents naturels les plus fréquents du rouissement des végétaux soient des bactéries appartenant aux genres *Plectridium* et *Clostridium*. Ce fait explique l'intérêt que présente l'étude de l'activité pectinolytique des germes de ces groupes. Nous nous sommes proposés de rechercher ou de vérifier le pouvoir pectinolytique de quelques bactéries appartenant à des espèces antérieurement décrites.

La liste des souches examinées est rapportée ci-dessous avec l'indication de leur origine.

<i>Plectridium pectinovorum</i>	Nº 3723	N. C. T. C.
<i>Plectridium pectinovorum</i>	P. J.	Weizmann et Hellinger [1].
<i>Plectridium pectinovorum</i>	P. C.	C. A.
<i>Plectridium virens</i>		C. A-
<i>Cl. corallinum</i>	TIR	C. A.
<i>Cl. aurantibutyricum</i>	W45	Hellinger [E.] [2]
<i>Cl. aurantibutyricum</i>	Hf 1	Hellinger (envoi personnel).
<i>Cl. roseum</i>	A39X	C. A.
<i>Cl. felsineum</i>	3220	N. C. T. C.
<i>Cl. succinobutyricum</i>	860	A. T. C.
<i>Cl. succinobutyricum</i>	GR4	C. A.
<i>Cl. saturnurubrum</i>		C. A.
<i>Cl. acetylbutylicum</i>	BY	Weizmann [1 bis].
<i>Cl. butyricum</i>	C8	C. A.

N. C. T. C., National Collection of Type Culture (London); A. T. C., American Type Culture Collection (Washington); C. A., Collection des anaérobies de l'Institut Pasteur.

Deux souches ont été isolées par nous-mêmes à partir de liquides de rouissement (ramie rouie à 37°) sur le milieu suivant qui s'est révélé très utile, soit pour l'enrichissement, soit pour l'isolement :

Placer 500 g de pommes de terre coupées en morceaux dans 1 000 cm³ d'eau ordinaire et porter à l'ébullition pendant trente minutes. Au liquide décanté on ajoute 5 g d'extrait de levure Difco. Répartir et stériliser à 115° trente minutes. Le pH varie

entre 6,9 et 7,2. Le même milieu additionné de 10 g par litre de gélose et réparti en tubes de 8 mm permet l'isolement.

Les milieux additionnés de peptone ou de viande sont très défavorables à la culture de certaines bactéries anaérobies pectinolytiques, en particulier de *Cl. aurantibutyricum* et *Cl. butyricum* C 8.

L'une des souches que nous avons isolées est un bâtonnet à spores terminales dont les caractères correspondent à la description classique de *Pl. pectinovorum*. La liquéfaction de la gélatine est tardive (vingt-cinq jours).

Le deuxième germe isolé est un bâtonnet Gram-positif, mobile, présentant des spores ovales subterminales, anaérobie strict, thermo-résistant (une minute à 100°), poussant bien entre 20° et 37°. Il ne se développe pas sur milieux à base de viande ou de peptone. En milieu pomme de terre-levure, il provoque un dégagement de gaz très abondant ; dans ce même milieu gélosé, les colonies sont lenticulaires et présentent à la longue (dix jours) une coloration brune légère. La gélatine n'est pas liquéfiée, le lait est coagulé lentement (dix jours). De nombreux glucides sont attaqués : glucose, lévulose, galactose, maltose, saccharose, lactose, mannitol, amidon. Sur bouillie de pomme de terre, il donne des gaz très abondants et la pomme de terre est désintégrée presque entièrement. Il ne forme pas d'H₂S ni d'indol. En milieu pomme de terre-levure glucosé à 10 p. 1 000, il forme de l'acide butyrique et de l'acide acétique $\frac{B}{A} = \frac{4}{1}$ avec des traces d'acétone et pas d'acétylméthylecarbinol.

Par ses caractères fermentaires : formation d'acide butyrique et acétique, peu ou pas de solvants neutres, absence de pouvoir gélatinolytique, ce germe se rattache à *Cl. butyricum* dont il constitue une variété pectinolytique.

TECHNIQUES.

1^o RECHERCHE DE LA PROTOPECTINASE. — On recherche le pouvoir du germe de désintégrer au cours de sa croissance un fragment de tissu végétal : carotte ou pomme de terre.

Les résultats varient suivant la technique employée pour préparer les milieux. Si on prépare les fragments de tissu suivant la méthode habituellement utilisée pour les cultures sur pomme de terre solide, le développement en anaérobiose est parfois lent et les résultats de l'attaque irréguliers. Ainsi Hellinger [2] a noté que les fragments de carotte étaient désintégrés complètement par *Cl. aurantibutyricum*, alors que ceux de pomme de terre n'étaient que très faiblement attaqués. Nous préférerons la technique suivante : les fragments de tissus végétaux sont stérilisés par la

technique habituelle, en tubes à étranglement. On ajoute asceptiquement un volume de milieu nutritif (eau de pomme de terre-levure) suffisant pour recouvrir le fragment de tissu. On assure l'anaérobiose par addition d'un réducteur (réductose) et on ensemente sans régénération. La culture anaérobie se fait ainsi à l'air libre, le développement en milieu liquide est très abondant et l'attaque du tissu est bien visible ; elle se manifeste par une désintégration complète.

De tous les germes étudiés, seul *Cl. aurantibutyricum* est capable de désintégrer les fragments de carotte et de pomme de terre, les premiers très rapidement (quarante-huit heures), les seconds en trois à quatre jours.

2^o RECHERCHE DE LA PECTINESTÉRASE. — Nous avons appliqué aux suspensions bactériennes le test de diffusion mis au point par Reid [3] pour les pectinestérases solubles.

On utilise une solution de pectine de citron (Pectine NF VII de la California Grows Exchange) à 1 p. 100, ajustée à pH 6, et solidifiée par 1,5 p. 100 de gélose, colorée au rouge de méthyle (conc. finale 0,01 p. 100). On coule en boîtes de Petri sans précautions spéciales de stérilité. Après solidification, on creuse des cupules à l'emporte-pièce, comme pour la mesure de l'activité des antibiotiques ; à l'intérieur de la cupule on place une suspension dense en eau physiologique des germes préalablement lavés une fois à l'eau distillée. On effectue un essai-témoin (gélose colorée sans pectine). On place à l'étuve à 37°, quatre à huit heures. La présence de pectinestérase dans la suspension se manifeste par un halo rouge sur fond jaune. Le témoin sans pectine reste sans changement.

L'emploi de ce test avec les suspensions bactériennes présente certains aléas : si la suspension n'est pas lavée, elle contient des substances acides qui provoquent le virage, même dans les témoins ; d'où la nécessité de toujours contrôler cet effet non spécifique comme il a été indiqué.

Nous avons obtenu un résultat positif avec *Cl. aurantibutyricum* W 45 et Hf 1 et *Cl. butyricum* C 8 ; *Cl. corallinum* a donné un résultat négatif.

Ce test qualitatif peut rendre de grands services pour la recherche rapide de l'activité pectinestérasique lors des isollements de germes.

Nous avons essayé d'utiliser le test indiqué par Reid [3] pour la polygalacturonidase en employant, comme substrat, de la pectine déméthylée. Nous n'avons pas obtenu de résultat positif avec les suspensions de *Cl. aurantibutyricum* pourtant pourvu d'une activité polygalacturonidasique importante. Les tests sur plaques de gélose avec des suspensions bactériennes ne peuvent

être positifs que si l'enzyme diffuse facilement dans la gélose. Ils ne peuvent donc avoir d'intérêt que lorsqu'ils sont positifs. Un résultat négatif ne permet pas d'affirmer l'absence de l'enzyme dans la suspension considérée.

3° L'ACTIVITÉ POLYGALACTURONIDASIQUE a été recherchée par la mesure de la chute de viscosité d'une solution de pectine hautement polymérisée sous l'influence d'une suspension bactérienne dense (8 mg d'azote bactérien au centimètre cube). On ajoute 10 cm³ de cette suspension à 50 cm³ d'une solution de pectine à 1 p. 100 ajustée à pH 7. Les fioles sont placées dans un bain-marie à 37°. Après six heures de contact, on élimine les corps microbiens par centrifugation et on mesure la viscosité du liquide obtenu au viscosimètre de Ostwald.

Les germes suivants sont dépourvus d'activité : *Cl. felsineum*, *Cl. corallinum*, *Cl. saturnirubrum*, *Cl. roseum*, *Cl. saccharo-butyricum* GR 4, *Pl. pectinovorum* 3723, *Pl. pectinovorum* PJ.

Cl. saccharo-butyricum 860 et *Pl. virens* n'ont qu'une activité très faible qui ne se manifeste qu'en vingt-quatre heures, tandis que *Cl. aurantibutyricum*, *Pl. pectinovorum* PC, *Cl. butyricum* C 8, *Cl. acetobutylicum* BY provoquent une baisse très nette de la viscosité en six heures.

TABLEAU I. — Viscosité relative $\left(\frac{n}{n_0}\right)$ à 20° de la solution de pectine avant et après action de divers germes anaérobies,

Solution de pectine témoin	16
<i>Cl. aurantibutyricum</i> W45	1,25
<i>Cl. aurantibutyricum</i> Hf1	1,75
<i>Pl. pectinovorum</i> PC	2,50
<i>Cl. butyricum</i> C8	5
<i>Cl. acetobutylicum</i> BY	11

4° RECHERCHE QUANTITATIVE DE L'ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE. — Le principe consiste à doser la pectine résiduelle dans une culture de trois à six jours en milieu nutritif additionné de pectine. On détermine, dans ces conditions, l'action des germes sur une pectine très modifiée, car la stérilisation par la chaleur provoque une dépolymérisation importante.

Nous avons employé le milieu eau de pomme de terre-extrait de levure auquel nous avons ajouté un volume égal de solution de pectine à 2 p. 100 (pectine NF VII). Le milieu est ajusté à pH 7 et stérilisé à 115° trente minutes. Après stérilisation, on rajuste le pH à 7 et on ensemence.

Le dosage de pectine est effectué par la méthode de Hinton [4]. Dans un certain nombre de cas, nous avons déterminé l'acidité totale et l'acidité volatile totale. L'augmentation de ces acidités ne constitue pas un indice de l'attaque des pectines sur un milieu

complexe, car elle peut être élevée sans que cette attaque soit importante.

TABLEAU II. — Pourcentage de pectine attaquée
après six jours de culture à 37°.

	MOYENNE	NOMBRE de cultures effectuées
<i>Cl. sporogenes</i> GO1	0	3
<i>Cl. saccharobutyricum</i> GR4	0	3
<i>Cl. roseum</i> A39X.	6,7	4
<i>Cl. felsineum</i>	5,8	5
<i>Cl. corallinum</i>	4	7
<i>Cl. saturnirubrum</i>	3	3
<i>Pl. pectinovorum</i> PJ.	7	6
<i>Pl. pectinovorum</i> 3723	20,2	7
<i>Cl. saccharobutyricum</i> 860	43	4
<i>Cl. acetobutylicum</i> BY	47	2
<i>Pl. virens</i>	92	1
<i>Cl. butyricum</i> Cs.	100	
<i>Pl. pectinovorum</i> PC	100	
<i>Cl. aurantibutyricum</i> W45	100	
<i>Cl. aurantibutyricum</i> Hf 1	100	

5° ATTAQUE DU GALACTURONATE DE SODIUM. — Il était intéressant de voir si les germes pectinolytiques étaient capables d'utiliser le galacturonate de sodium qui est l'élément fondamental de la molécule de pectine. Nous avons effectué cette recherche en cultivant les bactéries en eau peptonée additionnée de galacturonate. La solution de galacturonate de sodium est obtenue en neutralisant une solution à 2 p. 100 d'acide galacturonique, que l'on stérilise par filtration. On ajoute stérilement un volume de cette solution à un volume d'eau peptonée à 2 p. 100 stérilisée à l'autoclave et de pH 7. On répartit en tubes de 5 cm³ et on ajoute 1 goutte d'extrait de levure concentré. Après deux jours de culture à 37°, on mesure le pH et on dose l'acide galacturonique résiduel grâce à son pouvoir réducteur par la méthode de Somogyi [5].

TABLEAU III.

	(1)	(2)
<i>Cl. aurantibutyricum</i>	100	4,8
<i>Cl. saturnirubrum</i>	4	5,5
<i>Cl. corallinum</i>	0	6,45
<i>Cl. roseum</i>	0	6,40
<i>Cl. felsineum</i>	0	6,60
<i>Pl. pectinovorum</i> 3723	100	4,90
<i>Pl. pectinovorum</i> P. J.	100	4,70
<i>Cl. saccharobutyricum</i> 860	100	4,70
<i>Cl. saccharobutyricum</i> GR4.	54	5,50
<i>Cl. sporogenes</i>	0	6,40

Colonne (1). Pourcentage d'acide galacturonique fermenté ; colonne (2), pH final.

CONCLUSIONS.

Les germes que nous avons étudiés peuvent se répartir en plusieurs groupes :

1^o *Cl. aurantibutyricum* a fourni des résultats positifs avec tous les tests utilisés. Il est facile de mettre en évidence, pour ce germe pourvu d'une activité pectinolytique intense, les différents enzymes suivants : protopectinase, pectinestérase, polygalacturonidase.

2^o *Pl. pectinovorum* PC, *Cl. butyricum* C 8, *Cl. acetobutylicum* BY ont une activité marquée : en suspension, ils abaissent notablement la viscosité des solutions de pectine ; en culture, ils consomment en proportion élevée la pectine ajoutée au milieu.

3^o *Pl. virens* et *Cl. saccharobutyricum* 860 attaquent la pectine en culture, mais leurs suspensions n'ont qu'une activité très faible sur cette dernière.

Pour toutes ces bactéries, l'activité pectinolytique paraît être un caractère stable, car elle se maintient au cours des repiquages, souvent très nombreux, subis par ces souches.

4^o *Cl. roseum* A 39 X, *Cl. felsineum*, *Cl. corallinum*, *Cl. saturinirubrum*, *Pl. pectinovorum* PJ et 3723 n'ont aucune activité en suspension ; en culture, la baisse du taux de pectine est toujours faible (*Pl. pectinovorum* 3723) ou négligeable (inférieure à 10 p. 100) pour les autres. Certaines de ces souches appartiennent pourtant à des espèces qui ont été décrites comme pectinolytiques. L'explication la plus probable des résultats négatifs que nous avons obtenus est que l'activité pectinolytique n'est pas un caractère stable de ces espèces.

Par ailleurs, cette activité n'est pas limitée au groupe de *Pl. pectinovorum* ni à celui des bactéries anaérobies pigmentées. On trouve des souches pectinolytiques chez d'autres clostridies butyriques (*Cl. acetobutylicum* BY, *Cl. butyricum* C 8) sans, cependant, que toutes les bactéries butyriques présentent cette propriété : *Cl. saccharobutyricum* GR 4 nous a donné des résultats négatifs. Il en est des enzymes pectinolytiques, chez les anaérobies, comme de beaucoup d'autres enzymes : on les trouve chez diverses espèces dont l'ensemble ne constitue pas un groupe naturel.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CH. WEIZMANN et E. HELLINGER. *J. Bact.*, 1940, 40, 665.
- [1 bis] CH. WEIZMANN, U. S. pat. N° 1315585, 1919.
- [2] E. HELLINGER. *J. Gen. Microbiol.*, 1947, 1, 203.
- [3] W. W. REID. *Nature*, 1950, 166, 569.
- [4] HINTON. *Dep. Sci. Ind. Res. Food. Inv. Sp. Rep.* N° 48, 1939.
- [5] SOMOGYI. *J. Biol. Chem.*, 1945, 160, 61.

RECHERCHES SUR LA FLORE INTESTINALE ANAÉROBIE DU NOURRISSON NORMAL

par MONIQUE DIGEON et M. RAYNAUD.

(Institut Pasteur [Annexe de Garches]. Service des Anaérobies.)

On sait l'importance attribuée, depuis les travaux de Tissier [1, 2], à la présence dans les selles du nourrisson normal d'un germe particulier, *Bifidibacterium bifidum*. L'individualité de cette bactérie a été mise en doute par certains bactériologistes qui l'ont assimilée à *Lactobacillus acidophilus*. Du point de vue de la systématique il convient, avec A.-R. Prévot [3], de séparer sans ambiguïté ces deux germes, *Bif. bifidum* étant anaérobie strict, *L. acidophilus* aérobie facultatif. Nous nous sommes proposé de vérifier si *Bif. bifidum* se rencontre bien avec une fréquence élevée dans les selles du nourrisson normal et de rechercher les autres bactéries anaérobies éventuellement présentes. Comme matériel d'études, nous avons choisi les enfants de la crèche de l'hôpital Raymond-Poincaré, à Garches, pour des raisons de commodité. Cette crèche a compté, au cours de l'année où nous avons effectué cette recherche, 35 à 40 enfants âgés de moins de 1 an.

TECHNIQUE.

Les selles ont été prélevées sur les langes, placées en boîtes de Petri stériles et transportées au laboratoire où elles ont été mises en culture aussitôt.

Les anaérobies ont été isolés en gélose profonde en tubes de 8 mm de diamètre. Les milieux employés ont été le bouillon VF gélosé et le milieu de Blaurock [4]-Boventer [5] gélosé. Ce dernier est très favorable au développement de *Bif. bifidum* et au maintien des formes bifides de ce germe. Voici sa composition :

Foie de bœuf 500 g, eau 100 cm³. Faire bouillir deux heures. Filtrer. Ajouter au filtrat : peptone 10 g, NaCl 5 g, lactose 10 g, cystine 0,1 mg. Compléter à 1 000 cm³. Ajuster le pH à 7,4. Précipiter. Filtrer. Répartir. Stériliser. Nous avons remarqué, par la suite, que le développement de *Bif. bifidum* était plus rapide si le taux de cystine était porté à 10 mg par litre.

Tomarelli, Norris et György [6] ont préconisé l'addition de filtrat de lait coagulé à ce milieu. Nous avons pu constater que

l'addition de lait en faible proportion (1 p. 100) permettait une très bonne culture de *Bif. bifidum* sur eau peptonée lactosée. Le milieu est facile à préparer : peptone (Uclaf) 50 g, lactose 30 g, lait 10 cm³, eau q. s. p. 1 000 cm³. Ajuster le pH à 7,0-7,2. Précipiter à 120° pendant vingt minutes. Filtrer. Répartir. Stériliser.

Ce milieu permet l'entretien des souches de *Bif. bifidum* et fournit des cultures abondantes. Il est prudent de repiquer les souches tous les huit jours. La vitalité de ce germe sur les deux milieux que nous avons utilisés est en effet assez faible et nous n'avons pas observé de survie au delà de trois semaines à un mois.

TABLEAU I. — Proportions relatives du *bifidum*
et des autres germes anaérobies dans les selles étudiées.

NOMBRE de cas	MODE D'ALLAITEMENT	NOMBRE de colonies repiquées	NOMBRE de colonies anaérobies	NOMBRE de colonies <i>de bifidum</i>
4.	Artificiel (lait de vache).	15	9	6
2.	<i>Id.</i>	16	12	2
3.	<i>Id.</i>	16	10	3
4.	<i>Id.</i>	31	3	0
7.	<i>Id.</i>	18	2	1
9.	Artificiel (lait sec).	23	12	2
10.	Artificiel (lait de vache).	44	13	0
5.	Au sein.	25	19	12
6.	<i>Id.</i>	21	16	11
8.	<i>Id.</i>	30	22	17

Les résultats du tableau I montrent la fréquence de *Bif. bifidum* dans les selles du nourrisson normal. Dans ce premier groupe nous l'avons trouvé huit fois sur dix.

La proportion de *Bif. bifidum* par rapport aux autres anaérobies est beaucoup plus forte chez les enfants nourris au sein (cette proportion étant déterminée par le rapport nombre de colonies de *bifidum*/nombre de colonies d'autres anaérobies).

On notera, par ailleurs, que les deux seuls cas où le *bifidum* n'a pas été retrouvé concernent des enfants soumis à l'allaitement artificiel. La nature des germes trouvés est indiquée au tableau II.

La mise en évidence de *Micrococcus niger* est rapide sur gélose VF. Les colonies lenticulaires pigmentées en noir se reconnaissent facilement. La pigmentation ne se manifeste que lors des deux premiers repiquages. A partir de la troisième génération, les colonies sont blanches. Sur milieu de Blaurock, la pigmentation n'apparaît pas, même lors de la première culture.

TABLEAU II.

NOMBRE DE CAS	Anaérobies	Aérobies
1.	<i>Bifidibacterium bifidum.</i> <i>Micrococcus niger.</i> <i>Ristella insolita.</i> <i>Eubacterium ventriosum.</i>	Entérocoques.
2.	<i>Bifidibacterium bifidum.</i> <i>Micrococcus niger.</i>	Colibacille. Staphylocoque. Chromobacter.
3.	<i>Bifidibacterium bifidum.</i> <i>Micrococcus niger.</i> <i>Eubacterium biforme.</i>	Colibacille. <i>Proteus.</i> Entérocoque.
4.	<i>Micrococcus niger.</i> <i>Ristella perfoetens.</i>	Colibacille. Entérocoque.
5.	<i>Bifidibacterium bifidum.</i> <i>Micrococcus niger.</i> <i>Eubacterium aerofaciens.</i> <i>Ristella insolita.</i>	Colibacille. Entérocoque. Flexner.
6.	<i>Bifidibacterium bifidum.</i> <i>Eubacterium aerofaciens.</i> <i>Ristella insolita.</i>	Colibacille. Entérocoque.
7.	<i>Bifidibacterium bifidum.</i> <i>Micrococcus niger.</i>	Colibacille. Entérocoque.
8.	<i>Bifidibacterium bifidum.</i> <i>Micrococcus niger.</i> <i>Eubacterium aerofaciens.</i>	Colibacille. <i>Proteus.</i>
9.	<i>Bifidibacterium bifidum.</i> <i>Micrococcus niger.</i> <i>Eubacterium parvum.</i> <i>Ristella insolita.</i> <i>Ristella perfoetens.</i> <i>Paraplectrum malenominatum.</i>	Entérocoque.
10.	<i>Micrococcus niger.</i> <i>Ristella insolita.</i> <i>Acuformis dubitatus.</i>	Colibacille. <i>Proteus.</i> Entérocoque.

Dans un deuxième groupe de 10 nourrissons, nous avons simplement recherché *Bif. bifidum* et *Micrococcus niger*. Nous avons retrouvé ces deux bactéries dans les dix selles examinées (2 nourrissons nourris au sein, 6 soumis à l'allaitement artificiel, 2 à l'allaitement mixte).

Sur 20 nourrissons, apparemment normaux, nous avons donc retrouvé de façon quasi constante (90 p. 100 des cas) *Bif. bifidum*. Ce résultat apporte une confirmation des données classiques sur la flore anaérobie du nourrisson normal. Certains autres résultats sont à souligner :

- 1^o L'extrême fréquence de *Micrococcus niger* ;
- 2^o L'absence de germes anaérobies pathogènes ;
- 3^o L'absence de germes anaérobies protéolytiques (germe de la putréfaction) ;
- 4^o L'absence de *Lactobacillus acidophilus*.

Il est difficile d'affirmer l'absence complète de ces groupes. Ce que nous pouvons affirmer, c'est leur rareté certaine chez les enfants examinés, puisque nous n'en avons isolé aucun sur un total de 239 colonies repiquées (cas I à X du premier groupe).

Le fréquence élevée de *Micrococcus niger* mérite une mention particulière. Cet anaérobe a été signalé dans la vessie humaine et les organes génitaux de la femme, mais non dans le tube digestif du nourrisson. On retrouve là un fait analogue à celui qui avait été noté pour *Bif. bifidum*, qui fait partie de la flore vaginale normale et qui devient un hôte prépondérant de l'intestin du nourrisson normal.

RÉSUMÉ.

L'étude de la flore anaérobie du nourrisson normal a confirmé la fréquence de *Bif. bifidum* et montré la présence presque aussi abondante de *Micrococcus niger*. On n'a pas trouvé d'anaérobie pathogène ni d'anaérobie protéolytique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. TISSIER. *Thèse Paris*, 1900.
- [2] H. TISSIER. *Ces Annales*, 1905, **19**, 109.
- [3] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification et de détermination des bactéries anaérobies*, 2^e édit., Paris, 1948.
- [4] BLAUROCK. *Monatschr. Kinderheilk.*, 1937, **86**, 304.
- [5] BOVENTER. *Zentralbl. Bakt. I. O.*, 1938, **142**, 419.
- [6] R. M. TOMARELLI, R. F. NORRIS et P. GYÖRGY. *J. Biol. Chem.*, 1949, **181**, 879.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 3 Janvier 1952.

Présidence de M. PRÉVOT.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter à la Société, au nom de notre collègue R. Buttiaux, l'ouvrage qu'il vient de publier sur *L'analyse bactériologique des eaux de consommation* (1).

Ce livre, qui s'ajoute aux volumes déjà existants de la collection de l'Institut Pasteur, vient à son heure. Il présente une revue générale des méthodes d'analyse bactériologique des eaux, conçue dans un esprit essentiellement pratique. L'expérience personnelle de l'auteur sur un sujet auquel il a apporté d'importantes contributions lui a permis de présenter de façon claire, concise, mais jamais schématique, non seulement les techniques d'analyse mais encore celles de préparation des milieux et d'identification des germes.

Les premiers chapitres de l'ouvrage indiquent les méthodes générales de prélèvement des eaux, de transport, de dilution des eaux à examiner, de même que les principes de numération des germes. La colimétrie occupe, ainsi qu'il se doit, une part importante de l'ouvrage. L'auteur a judicieusement fait un choix parmi les méthodes proposées et indique la technique qu'il recommande (combinaison de celles de Kligler et de Vincent) et qui est un perfectionnement de la méthode dite standard.

Les chapitres suivants traitent de la recherche et de la numération de l'entérocoque, de *Cl. perfringens*, des germes putrides, des bactériophages, etc. La recherche des germes pathogènes (*Salmonella* et *Shigella*, vibron cholérique, leptospires, etc.) et des germes saprophytes occupe la deuxième partie de l'ouvrage.

Le livre se termine par un schéma récapitulatif de l'analyse bactériologique complète d'une eau de consommation qui reproduit sous forme d'un tableau illustré la marche à suivre dans l'opération, et par des modèles d'analyses bactériologiques qui serviront de guide dans la rédaction de rapports.

(1) Collection de l'Institut Pasteur, *Editions Médicales Flammarion*, 22, rue de Vaugirard, Paris-6^e, 1951, Préface de R. Dujarric de la Rivière, 209 pages, prix : 1 000 fr.

Un tel ouvrage, qui manquait dans la littérature française, s'imposera à tous les laboratoires chargés des analyses bactériologiques des eaux. Comme le dit R. Dujarric de la Rivière dans la préface, « il figuera aussi avec honneur dans la bibliothèque de tous les hommes de science qu'intéresse un sujet dont on ne voit trop souvent que le côté pratique, mais qui peut être l'occasion de recherches théoriques fort attachantes ».

Une seule critique de forme à adresser à ce livre sympathique et, par ailleurs, si hautement recommandable : l'abus des mots anglo-saxons, explicable sans doute par un sujet fortement influencé par les techniques américaines, mais où le linguiste relève avec regret les mots de « sewage », « lactose broth », « agar », là où les termes français d'« eau d'égout », « bouillon lactosé », « gélose » auraient la même clarté.

COMMUNICATIONS

SUR LA NON-FIXATION DU CUIVRE MINÉRAL PAR LE VIRUS VACCINAL

par P. LÉPINE, G. WIELGOSZ et L. REINIÉ.

(*Institut Pasteur : Service des Virus*)

Hoagland, Ward, Smadel et Rivers [1], appliquant les méthodes spectrographiques et chimiques, ont montré, en 1941, la présence de cuivre dans le virus vaccinal. Le taux de cuivre (0,05 p. 100) rencontré dans les corpuscules de virus vaccinal isolés de la peau du lapin [2] est significativement différent de celui trouvé (0,002 p. 100) dans la pulpe dermique ou les tissus normaux. Il augmente jusqu'à vingt-cinq fois avec la concentration du virus et varie parallèlement avec le taux de celui-ci, alors que toutes traces d'autres métaux disparaissent au cours de la purification. Il y a lieu de penser avec Smadel et Hoagland [3] que le cuivre constitue ainsi un élément essentiel du virus vaccinal.

Bien que l'hypothèse n'ait pu être l'objet de vérifications expérimentales, plusieurs auteurs ont déduit de ces faits que le cuivre intervientrait comme facteur déterminant dans la virulence des corpuscules élémentaires. Que cette vue soit fondée ou non, la présence de cuivre en quantités significatives dans le virus vaccinal pourrait ouvrir la porte à une étude intéressante du métabolisme éventuel de ce virus par la recherche des substrats à partir desquels il assimilerait le métal et par la façon dont ce dernier serait lié à la particule élémentaire.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes proposés d'étudier la fixation du cuivre par le virus vaccinal, en lui fournissant du cuivre marqué dont il serait possible de suivre le destin selon les techniques d'étude des radio-isotopes. La méthode envisagée consistait à alimenter en cuivre le virus par l'introduction de l'élément marqué dans des œufs fécondés en incubation, inoculés avec le virus vaccinal. L'addi-

tion de cuivre devait être faite au début de la période de développement maximum du virus, ce dernier devant être ensuite extrait selon les techniques classiques, afin d'être soumis au compteur de Geiger-Muller, comparativement aux tissus de l'œuf et de l'embryon afin de déterminer la répartition du cuivre et les quantités éventuellement fixées par le virus.

Quatre séries de 15 œufs en incubation ont été utilisées.

La série n° 1 a reçu par inoculation sur la membrane chorio-allantoïdienne au onzième jour de l'incubation un virus de neurovaccine habitué à cultiver dans l'œuf. Après quatre-vingts heures de développement du virus, chaque œuf a reçu 50 µg de cuivre radioactif (1), sous la forme de sulfate dissous dans 0,5 ml d'eau physiologique ; dix heures après cette opération, les œufs ont été sacrifiés et les corpuscules vaccinaux extraits suivant la méthode de Smadel et Wall [4].

La série n° 2 constitue le témoin de la série n° 1. Des œufs de même âge d'incubation, mais n'ayant pas été inoculés de vaccine, ont reçu au même moment que les précédents des quantités identiques de cuivre radioactif. L'extraction finale et la purification permettent dans ces conditions l'obtention de particules dites « corpuscules normaux », c'est-à-dire des corpuscules de même taille que le virus vaccinal, que l'on rencontre normalement dans les membranes chorio-allantoïdiennes de l'œuf en incubation et qui sont vraisemblablement des débris nucléaires sélectionnés par la centrifugation [5].

Les séries 3 et 4 ont été disposées de même, l'une sur des œufs inoculés de vaccine, l'autre sur des œufs témoins, mais l'injection de cuivre a été exécutée dans les deux séries dix heures après l'inoculation de vaccine aux œufs de la série n° 3, les œufs étant eux-mêmes ouverts et traités pour l'extraction des corpuscules vaccinaux ou normaux dix heures après l'injection du cuivre.

Les moments choisis dans les deux groupes d'expériences, soit quatre-vingts heures (série 1) et dix heures (série 3) après l'infection par la vaccine, correspondent aux moments déterminés par nos recherches antérieures [6], des maxima arithmétique et logarithmique de la croissance du virus vaccinal, moments où l'on pouvait prévoir un taux maximum d'assimilation du cuivre par le virus en voie de multiplication, si ce métal constitue bien un élément essentiel de sa composition.

Le cuivre utilisé était l'isotope ^{64}Cu préparé à la pile atomique, dont l'activité spécifique est de 3,2 mC et dont la période est de 12,8 heures.

Les opérations d'extraction et de concentration du virus ont été conduites avec le maximum de célérité, de sorte que les mesures de radioactivité ont été effectuées neuf heures après l'ouverture des œufs, soit vingt-six à vingt-sept heures après la réception du cuivre radioactif. Les mesures ont été effectuées, grâce à l'obligeance du Dr Courssager, au laboratoire des isotopes de l'Hôpital Necker.

Résultats. — L'activité de nos échantillons exprimée en coups-minute (c/m) et rapportée à 1 mg de matière sèche a été la suivante (toutes corrections comprises) :

(1) Nous remercions M. le Prof. Terroine et le Commissariat à l'Energie Atomique, d'avoir bien voulu mettre à notre disposition le cuivre radioactif préparé à la pile atomique de Châtillon.

Echantillon n° 1 : virus vaccinal extrait après quatre vingt-dix heures : $0,72 \text{ c/m} \pm 0,17$.

Echantillon n° 2 : corpuscules normaux (témoins de l'échantillon n° 1) : $0,62 \text{ c/m} \pm 0,06$.

Echantillon n° 3 : virus vaccinal extrait après vingt heures : $0,52 \text{ c/m} \pm 0,18$.

Echantillon n° 4 : corpuscules normaux (témoins du n° 3) : $1,48 \text{ c/m} \pm 0,19$.

On voit que la quantité de cuivre contenue dans le virus est apparemment supérieure à celle des milieux témoins. Néanmoins, la différence est faible, et vu la marge d'incertitude résultant des erreurs expérimentales aux différents stades du mode opératoire, on ne peut pas conclure que la quantité de cuivre fixée par le virus diffère spécifiquement de celle fixée par les témoins. Il semble probable d'ailleurs, étant donné les taux fixés, qu'il s'agisse là d'une absorption du cuivre par les protéines [7], plutôt que d'une incorporation résultant d'un métabolisme actif.

La seule conclusion qui se dégage de cet essai est que le virus vaccinal s'est montré, dans nos expériences, incapable d'incorporer le cuivre qui lui était fourni sous forme de sulfate.

Ce résultat n'infirme pas les conclusions de Hoagland et collaborateurs, puisqu'il est possible, et même hautement probable, que le précurseur du cuivre entrant dans le virus vaccinal est de nature organique et non minérale. Le meilleur moyen d'en faire la démonstration au moyen du cuivre marqué serait de préparer des œufs renfermant du cuivre marqué sous forme organique, par exemple en nourrissant convenablement les poules pondeuses. Malheureusement, le seul isotope radioactif du cuivre actuellement utilisable est un isotope de période si courte (soit 12,8 heures), que, pratiquement, toute mesure précise devient impossible au delà de quarante-huit heures. En effet, l'augmentation des quantités du cuivre injecté dans les œufs ou fourni sous une forme quelconque aux animaux d'expérience, pour obtenir des taux mesurables au delà de quarante-huit heures, conduirait à l'utilisation de quantités de cuivre absolument incompatibles avec les données d'un métabolisme normal.

Conclusion. — Nous avons tenté de démontrer l'existence de quantités significatives de cuivre dans le virus vaccinal, et d'un métabolisme de ce métal par le virus, en essayant de fournir du sulfate de cuivre marqué à des œufs en incubation, inoculés de virus vaccinal, et de mesurer, comparativement aux corpuscules « normaux », la radioactivité du virus vaccinal finalement obtenu après extraction. Cet essai est resté infructueux, le virus vaccinal s'étant montré incapable de métaboliser directement le cuivre qui lui est offert sous forme de sulfate.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. L. HOAGLAND, S. M. WARD, J. E. SMADEL et T. M. RIVERS. *J. exp. Med.*, 1941, **74**, 69-80.
- [2] C. L. HOAGLAND, J. E. SMADEL et T. M. RIVERS. *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 737.
- [3] J. E. SMADEL et C. L. HOAGLAND. *Bact. Rev.*, 1942, **6**, 79.

- [4] J. E. SMADEL et M. J. WALL. *J. exp. Med.*, 1937, **66**, 325.
- [5] P. LÉPINE, J.-C. LEVADITI et J. GIUNTINI. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **436**, 285.
- [6] P. LÉPINE, G. WIELGOSZ et L. REINIÉ. *Ces Annales*, 1951, **81**, 77.
- [7] M. MACHEBOEUF et M. VISCONTINI. *Ces Annales*, 1945, **74**, 188.

**CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE
DES BACILLES ACIDO-ALCOOLO-RÉSISTANTS.**

**IV. ADSORPTION ET RÉDUCTION DES COLORANTS
VITaux PAR LES MYCOBACTÉRIES.**

par J. PARAF, J. DESBORDES et Et. FOURNIER (*).

(Hôpital Bichat, Laboratoire de Recherches physiologiques.
Service du Dr Jean Paraf.)

On utilise couramment en technique bactériologique, certaines actions de colorants de la cellule vivante sur des germes acido-alcoolo-résistants. C'est ainsi que Dubos et Middlebrook [1] ont souligné une action des bacilles tuberculeux vis-à-vis d'une solution aqueuse de rouge neutre dans des conditions de pH étroites [6, 7]. Les germes virulents prennent, on le sait, une teinte rouge et ceux avirulents deviennent jaunâtres ou restent normalement colorés en jaune plus ou moins pâle.

Bloch [2] propose la décoloration du bleu de méthylène par les bacilles comme test de non-virulence.

Desbordes et Fournier [3] décrivent les réactions de plusieurs souches de bacilles tuberculeux et paratuberculeux vis-à-vis de divers indicateurs colorés de rH, en particulier avec le bleu d'indophénol ou le bleu de méthylène. Ils montrent que le pouvoir réducteur diminue avec la virulence : les souches virulentes ne sont pas réductrices, les souches avirulentes sont réductrices, la vitesse de réduction croissant avec l'altération de la virulence. Le bacille BCG forme la charnière de ces deux catégories.

En ce qui concerne la réaction du rouge neutre à pH = 8,9, certains auteurs (Dubos, Sulcer [4] ou Asselineau et Lederer [5]) semblent avoir démontré l'importance des groupes acides de certaines molécules du bacille de Koch qui fixeraient le rouge neutre sous sa forme anionique. Aucun autre germe en dehors des Mycobactéries n'a été jusqu'ici coloré par le rouge neutre (Hauduroy et coll. [6], Vialler et coll.).

Vialler, Kalb et Tigaud [7] semblent même apporter la preuve qu'aucune action enzymatique n'intervient puisqu'ils précisent que les bacilles stérilisés à la chaleur, trente minutes à 120°, se colorent en rouge neutre à pH 8,9 comme les bacilles vivants.

(*) Travail subventionné par l'Institut National d'Hygiène.

Il est vraisemblable d'admettre que de tels phénomènes d'absorption interviennent avec les autres colorants, et que les lipides (acides mycoliques) y jouent leur rôle. Cependant, il nous semble dangereux de ne pas tenir compte de l'intensité des phénomènes enzymatiques dans l'explication de certaines réactions de coloration. En effet, nous avons étudié en détail le phénomène de fixation et de décoloration d'une solution de bleu de méthylène par une Mycobactéries facilement adaptée à ce genre de travail : le bacille de la fléole ; *Mycobacterium phleii*. (Un germe virulent tel que *Mycobacterium tuberculosis* ne décolorerait pas la solution, germe non réducteur.) Nous avons pu, de ce fait, assez facilement dissocier la réaction de réduction du phénomène d'adsorption.

Une émulsion du germe est préparée selon la technique classique du "resting bacteria" à raison de 0,10 g de bacille pour 3 cm³ de solution physiologique, refroidie à 0°, puis placée en tube de Thünberg avec 1 cm³ de solution à 1/10 000 de bleu de méthylène et 0,5 cm³ de solution tampon de phosphate de soude M/100 (pH = 6,65) dans le vide.

Nous avons noté que même sans tampon, le pH de la préparation reste fixe pendant plusieurs heures au voisinage de 6,3.

Dans ces conditions, le bacille de la fléole décolore la solution en trois minutes. Un bacille de Koch virulent ne décolore pas cette solution.

On observe donc, pour le cas de la fléole, les phénomènes suivants :

1^o Un premier temps d'environ une minute est consacré à une adsorption qui est suffisamment intense pour que les germes soient colorés en bleu foncé dans la solution bleue. Le bacille de la fléole virulent, comme le bacille de Koch virulent, se colorent à la même vitesse.

2^o Un deuxième temps, d'une durée d'une minute et demie, constitue une période de latence où l'on n'observe rien.

3^o Enfin, pendant une durée d'une minute environ, la solution se décolore, ainsi que les germes, mais beaucoup plus vite qu'eux. En une trentaine de secondes, le liquide est devenu incolore, alors que les germes sont encore nettement bleus. Il faut souvent attendre une minute et plus, pour voir le bleu de méthylène adsorbé se décolorer.

Bien entendu, on vérifie facilement qu'il s'est bien produit une réduction du colorant dissous et non une « refixation » secondaire de ce bleu, en ouvrant le tube de Thünberg et agitant légèrement la solution décantée. En deux ou trois secondes, la solution redevient bleue.

Nous avons montré ailleurs [8] que la vitesse de réduction obéit aux lois principales de l'enzymologie : effet du pH, de la chaleur, des inhibiteurs (pH optimum 6,5 à 6,8 ; température optimum 37° ; inhibition par l'alcool à 90, le phénol, l'ébullition, etc. En faisant la réserve que l'étude a porté sur des germes entiers, et non sur l'enzyme purifié.)

Si l'on traite la suspension bacillaire à 100° pendant dix minutes (ou à 70° pendant deux heures), l'adsorption du colorant sur les germes s'observe, mais la seconde partie, la décoloration, ne se produit plus.

Conclusions. — 1^o Nos observations confirment donc bien, tout au moins dans nos circonstances expérimentales et pour le bacille de la fléole, la dualité du phénomène.

a) Adsorption du colorant par le bacille ;

b) Réduction de celui-ci par les corps bacillaires, dans le cas des germes paratuberculeux et de certains bacilles tuberculeux avirulents.

2^o Elles montrent que des substances réductrices diffusent rapidement dans une suspension contenant des germes réducteurs (tuberculeux avirulents et paratuberculeux), mais que le phénomène de réduction observé satisfait en gros aux normes générales des réactions enzymatiques.

3^o A l'opposé, la constance du pH des solutions sans tampon montre que ces bacilles ne libèrent ni bases, ni acides solubles, tout au moins dans le cas des germes que nous avons utilisés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DUBOS et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1948, **58**, 698.
- [2] BLOCH. *Am. Rev. Tub.*, 1950, **61**, 270.
- [3] DESBORDES et coll. *Ces Annales*, 1950, **79**, 210.
- [4] Voir les références in J. DESBORDES : *Le diagnostic bactériologique des Mycobactéries*, 1 vol., Paris, 1951. Masson, Editeur.
- [5] ASSELINEAU et coll. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 142.
- [6] HAUDUROY et coll. *Ces Annales*, 1949, **77**, 91.
- [7] VIALLER et coll. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 1513.
- [8] DESBORDES et FOURNIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1952 (*sous presse*).

INFECTIONS A *SALMONELLA STANLEY* CHEZ L'HOMME ET LES COBAYES

par L. LE MINOR et R. SEYS.

Instituts Pasteur Paris [centre des « Salmonella »] et Saigon.)

Divers auteurs ont rapporté des épidémies dues aux Salmonelles chez les petits animaux de laboratoire. Il est particulièrement fréquent d'isoler dans de tels cas *S. typhi murium* et *S. enteritidis*. D'autres espèces telles que *S. cholerae suis*, *S. thompson*, *S. potsdam*, *S. virchow*, *S. anatum* (que Raynal a isolées de rats à Shanghai) peuvent parfois être trouvées. Nous rapportons ici une infection spontanée du cobaye par *S. stanley*. Cette espèce n'ayant jusqu'à présent été isolée que de l'homme, nous pensons utile de signaler sa présence éventuelle chez le cobaye.

En mai dernier, des cobayes inoculés six mois auparavant par voie intrapéritonéale par du BCG sont morts sans raison apparente. Ces cobayes étaient examinés chaque jour et pesés chaque semaine. Tous étaient en bonne santé apparente ; leurs courbes de poids étaient régulièrement ascendantes. Un matin, 5 cobayes d'une cage commune sont trouvés morts. L'autopsie ne montre rien d'anormal, mais la culture du sang du cœur est positive : chez 2 d'entre eux, nous avons

isolé *Escherichia coli*, mais chez les 3 autres, un germe du groupe des Salmonelles, ayant les caractères biochimiques suivants :

Lactose, saccharose et glycérine (Stern).	0	
Maltose, glycose, mannite, xylose et arabinose .	{	Production d'acide et gaz.
Lait tournesolé	0	
Rouge neutre		Réduit.
d-tartrate de sodium	+	
Citrate (milieu de Simmons)	+	
Urée	0	
Indol	0	
Acétyl-méthyl-carbinol	0	
Rouge de méthyl	+	
Formation d'H ₂ S	+	

Les caractères sérologiques sont :

1^o Agglutination qualitative sur lame, pratiquée avec les sérums polyvalents de l'Institut Pasteur de Paris :

T.	+	
B.	+	
A. C.	Négatifs.	

2^o Agglutination en présence des sérums spécifiques : positive avec les sérums anti-IV, V et d. La phase 2 (1,2) fut trouvée après culture du germe sur gélose de Sven Gard additionnée de sérum anti-d.

Pouvoir pathogène pour le cobaye. — 1^o Voies sous-cutanée et intramusculaire : après inoculation de 2 cm³ de culture de dix-huit heures en bouillon à 2 cobayes, on note la formation d'un abcès local qui se fistulise en dix jours. Avant fistulisation, une ponction a montré un pus jaunâtre, mal lié. La culture de ce pus donne à l'état pur la même Salmonelle. L'état général des animaux reste excellent : ils sont d'ailleurs encore vivants trente jours plus tard.

2^o Voie intrapéritonéale : après inoculation de 1 cm³ de culture de dix-huit heures en bouillon, les animaux sont encore vivants au quarante-cinquième jour, l'hémoculture est négative, mais le séro-diagnostic pratiqué le dixième jour donne :

Pour 3 cobayes : *S. stanley* 1/800.

Pour 2 cobayes : *S. stanley* 1/1 600.

3^o Voie buccale : chaque jour, 10 cm³ de culture de dix-huit heures en bouillon sont mélangés à la nourriture solide (paddy germé) qu'absorbent les animaux. 2 cobayes meurent rapidement d'infection intercurrente, leur autopsie est négative. 2 autres cobayes donnent des signes analogues à ceux inoculés par voie péritonéale : hémoculture négative, séro-diagnostic du dixième jour positif à 1/400 pour *S. stanley*. Mais une coproculture systématiquement pratiquée est positive à partir du cinquième jour pour *S. stanley*. L'un de ces cobayes meurt en vingt et un jours : son autopsie ne montre rien d'anormal. Le dernier meurt en un mois, avec un abcès du foie du volume d'un petit pois, contenant un pus épais, ayant la consistance du plâtre fraîchement gâché, mais de couleur jaunâtre. L'hémoculture donne un germe du groupe *Paracolobactrum*. Par contre, la culture de l'abcès du foie donne *Salmonella stanley* à l'état pur.

Pouvoir pathogène pour la souris. — 1^o Voie intraperitoneale : 3 souris sur 3 meurent en huit jours : leur autopsie ne montre rien d'anormal.

2^o Voie buccale : 3 souris sur 3 encore vivantes trente jours plus tard.

En somme, le pouvoir pathogène expérimental de ce germe se ramène à ceci : *S. stanley* est expérimentalement capable de déterminer chez le cobaye un abcès cutané local lors des injections par voie sous-cutanée ou intramusculaire, ou dans certains cas un abcès du foie lors de l'absorption par voie buccale. Les animaux ne font pas de fièvre et ne subissent aucune perte de poids. L'hémoculture est constamment négative ; par contre, le séro-diagnostic devient positif pour *S. stanley* vers le dixième ou le douzième jour. La voie buccale détermine, de plus, une élimination du germe par voie fécale, et la coproculture est positive. Chez la souris, on ne note aucune action nette.

Les précautions habituelles à toute épizootie ont été prises aussitôt pour protéger le reste de nos cobayes et éviter la propagation de l'infection : désinfection de la cage au crésyl, puis à la flamme. Les cobayes ayant été en contact avec les sujets malades furent isolés. Les séro-diagnostic, pratiqués chez ces derniers un mois après, donnèrent un résultat négatif, non seulement pour les germes T, A, B, C, mais également pour *Salmonella stanley*.

Il ne nous a pas été possible de retrouver l'origine de cette infection. L'origine alimentaire (feuilles de patate douce et paddy germé) est possible, mais tous nos animaux reçoivent la même alimentation et aucun autre cas d'infection ne s'est présenté, ni à la même époque, ni depuis. Par ailleurs, chez ces cobayes inoculés par du BCG depuis six mois, on ne peut incriminer un flétrissement passager de leurs défenses, qui serait dû à l'inoculation expérimentale.

L'individualité du type *Stanley* a été établie en 1920 par Schutze. Les souches étudiées provenaient d'intoxication alimentaire. D'autres souches furent étudiées par Savage et White (1925), White (1926), toutes d'origine humaine. Kauffmann, en 1930, décrit 22 cas de gastro-entérites humaines d'où il isola cette Salmonelle. Hales, en 1934, rapporta une observation de gastro-entérite due à *S. stanley*. En 1935, de Moor en signale 2 cas à Java. En 1938, Tesdal décrit 4 souches de *Stanley* d'origine inconnue, en étudiant des germes étiquetés paratyphiques B. En 1938, Ernst et Kauffmann signalent une entérite à *S. stanley*, dont le séro-diagnostic était positif au 1/200 antigène IV-V et au 1/12 800 antigène d.

Tulloch, en 1939, décrit deux gastro-entérites aiguës causées par *S. stanley*. En 1940, Hohn et Hermann rapportent une infection sévère due à *S. stanley* chez un enfant âgé de 4 mois qui élimina les germes par les selles durant cinq mois. Dans leur revue publiée en 1943, sur les types de *Salmonella* isolés en Australie, Atkinson et Woodroffe signalent l'*Salmonella stanley* isolée d'un empoisonnement alimentaire. Dans un nouvel article publié en collaboration avec Macbeth, en 1947, ils signalent 2 souches de *S. stanley* provenant l'une de selles d'enfant atteint de gastro-entérite, l'autre d'un porteur sain. Seligman, Saphra et Wassermann, en 1944, ont isolé chez une personne bien portante 1 *S. stanley* (dans leur article de 1946, portant sur 2 916 *Salmonella*

identifiées dans leur laboratoire, cette souche de *S. stanley* reste unique). Edwards, Bruner et Moran (1948) n'ont trouvé, sur 12 331 Salmonelles étudiées, réparties en 111 types, que 3 *S. stanley* isolées par coproculture de gastro-entérites. En 1950, dans leur étude sur les Salmonelles isolées d'enfants et d'animaux domestiques, Watt et de Capito ne citent, sur 387 Salmonelles isolées, qu'une seule *S. stanley* provenant d'un enfant bien portant. Topley et Wilson signalent la présence de *S. stanley* dans des œufs en poudre importés d'Amérique en Angleterre. Dans le rapport publié par le Public Health Laboratory Service, relatif aux Salmonelles isolées en Grande-Bretagne, Cokburn signale 3 *S. stanley* isolées de 1923 à 1929, 1 en 1941, 4 en 1948 et 8 en 1949. Enfin, Schmid isola, en 1950, 2 souches de *S. stanley* par coproculture à Ceylan. Ces dernières sont signalées par Moritsch comme fermentant rapidement le *l*-tartrate de sodium, contrairement aux *S. stanley* habituelles.

L'un de nous a étudié une *S. stanley* isolée par coproculture à Hanoï (Dr Kirche) et 3 autres provenant de Lyon, adressées pour lysotypie au service du bactériophage de l'Institut Pasteur (Dr Nicolle), sous l'étiquette de *S. typhi*. Toutes 3 furent isolées d'hémoculture. Voici les renseignements que nous avons pu obtenir pour 2 d'entre elles :

M. S..., 17 ans. Entre à l'hôpital le 25 août 1949, au cinquième jour d'une fièvre en plateau à 40°. Syndrome typhoïdique sévère, somnolence, météorisme abdominal, splénomégalie. Pas de taches rosées ni d'ulcération pharyngée. Traitement par la chloromycétine. Après la dose de charge (3 g + 3 g), aggravation du délire. Ascension thermique à 41°. Pas de collapsus. Traitement poursuivi pendant quatre jours à la dose quotidienne de 3 g. Apyrexie au cinquième jour du traitement, sans phase hypothermique. Rechute au neuvième jour de l'apyraxie avec, de nouveau, syndrome typhoïdique dont le seul élément de sévérité est la température à 40°5. Le traitement par la chloromycétine est repris à la dose de charge 3 g + 3 g (suivie d'une ascension thermique à 41°), puis doses dégressives pendant dix jours. L'apyraxie est obtenue le quatrième jour du traitement après une courte phase hypothermique. Guérison durable. L'hémoculture fut positive à *S. stanley* à l'entrée et lors de la rechute. Les séro-diagnostic furent positifs au TH au 1/400 à l'entrée et lors de la rechute.

Enfant D..., 4 ans. Entre à l'hôpital le 26 septembre 1949, au quatrième jour d'un syndrome typhoïdique de gravité moyenne. Température à 39°. Pas de splénomégalie. Pas de taches rosées. L'enfant a eu une épistaxis avant l'entrée. Pas de tuphos. Traitement par la chloromycétine : la dose de charge est suivie d'une ascension thermique à 40°5. Cette thérapeutique est poursuivie pendant neuf jours à doses dégressives. L'enfant est apyrétique le quatrième jour du traitement. Il fait une rechute le onzième jour. La chloromycétine est administrée à nouveau pendant douze jours et amène la guérison. L'hémoculture fut positive à *S. stanley* à l'entrée, le séro-diagnostic positif au TH au 1/100, le 26 septembre 1949, et au 1/400 le 13 octobre 1949.

Bien que *S. stanley* n'ait pas été isolée chez la mère de cet enfant, il fut vraisemblablement l'agent causal de la maladie qu'elle fit au même moment : Mme D..., 27 ans, entre avec son enfant à l'hôpital le 26 septembre 1949. Elle présente un syndrome typhoïdique bénin (38°8). Splénomégalie, quelques taches rosées, aucun trouble de la conscience. La dose de charge de chloromycétine (3 g + 3 g) amena une ascension thermique

à 39°8 sans collapsus. Cette thérapeutique fut poursuivie pendant onze jours à doses dégressives. L'apyrexie fut obtenue le septième jour. Le seizième jour, il apparut une myosite du sterno-cléido-mastoidien, avec ascension thermique à 38°5 pendant trois jours. Le traitement par la chloromycétine fut repris et amena la guérison. L'hémoculture fut négative à l'entrée et au moment de la recrudescence thermique. Les sérodiagnostics donnèrent les résultats suivants avec la suspension TH :

26 septembre 1949	1/50
6 octobre 1949	1/100
23 octobre 1949	1/1 600

Il est regrettable que dans tous ces cas, des coprocultures n'aient pas été pratiquées. L'origine de ces infections n'a pas pu être déterminée.

En définitive, nous voyons que *S. stanley* possède un pouvoir pathogène variable, tant chez l'homme que chez l'animal. Cette Salmonelle fut trouvée aussi bien chez des porteurs sains que dans des cas d'entérite banale et dans des syndromes typhoïdiques graves. On peut, dans certains cas, l'isoler par hémoculture. Chez le cobaye, en infection spontanée, elle a provoqué la mort des animaux. Par contre, le pouvoir pathogène expérimental sur cobaye et souris fut faible.

Résumé. — Au cours d'une épizootie chez des cobayes, à Saigon, *Salmonella stanley* fut isolée à trois reprises. C'est la première fois que la présence de cette *Salmonella* est signalée chez l'animal.

Les auteurs rapportent aussi 3 observations d'infection humaine à *S. stanley*, et font à ce sujet une revue bibliographique relative à cette espèce.

BIBLIOGRAPHIE

N. ATKINSON et G. WOODROOFE. *South Austr. J.*, 1941-1944, **2**, article 36.
 N. ATKINSON, G. WOODROOFE et H. MACBETH. *Austr. J. exp. Biol.*, 1947, **25**, 25.
 W. L. COCKBURN. *Month. Bull. publ. Health Labor. Service*, 1950, **9**, 254.
 P. R. EDWARDS, D. W. BRUNER et A. B. MORAN. *J. inf. Dis.*, 1948, **83**, 220.
 J. H. ERNST et F. KAUFFMANN. *Ugeskr. f. Laeger*, 1938, 88.
 H. HABS. *Zeitschr. Hyg.*, 1934, **116**, 537.
 J. HOHN et W. HERMANN. *Zentralbl. Bakter.*, 1940, **145**, 209.
 F. KAUFFMANN. *Zeitschr. Hyg.*, 1930, **111**, 210..
 H. MORITSCH. *Acta Pathol. Microb. Scand.*, 1951, **229**, 239.
 C. E. DE MOOR et V. D. MEDEEEL. *Dienst d. Volksgezondh. in Nederl. Indie*, 1935, **24**, 98.
 J. H. RAYNAL. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1947, **40**, 212.
 SAVAGE et P. BRUCE WHITE. *Med. Res. Coun. Spec. Rep. Ser.*, 1925, n° 91.
 E. E. SCHMID. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, 1951, **30**, 391.
 H. SCHUTZE. *Lancet*, 1920, **1**, 93.
 E. SELIGMANN, J. SAPHRA et M. WASSERMANN. *Amer J. Hyg.*, 1944, **40**, 227.
 E. SELIGMANN, J. SAPHRA et M. WASSERMANN. *J. Immunol.*, 1946, **54**, 69.
 M. TESDAL. *Zeitschr. Hyg.*, 1937, **120**, 21.
 TOPLEY et WILSON. *Principles of Bacteriology and Immunity*. Arnold, édit., Londres, 1947, 728.
 W. J. TULLOCH. *J. Hyg.*, 1939, **39**, 324.
 J. WATT et T. DE CAPITO. *Amer. J. Hyg.*, 1950, **51**, 343.
 P. B. WHITE. *Spec. Rep. Med. Res. Coun.*, 1926, n° 103.

RECHERCHES SUR LA SURVIE DES BACTERIES ANAÉROBIES EN EAU DE MER

par B.-CH. CALLAME.

(*Institut Pasteur, Service des Anaérobies,
et Centre de Recherches et d'Etudes Océanographiques [C. R. E. O.]*)

Parmi les nombreux problèmes de bactériologie marine exposés récemment par A.-R. Prévot [1], celui de la survie des bactéries dans l'eau de mer nous a paru d'une grande importance théorique et pratique.

On sait, en effet, que cette survie ne dépasse pas quinze jours à trois semaines pour beaucoup de bactéries, mais on ne sait pas combien de temps vivent la plupart des bactéries pathogènes dans l'eau de mer.

La résistance des microbes pathogènes peut fournir des données intéressantes sur l'étiologie des maladies contractées au bord de la mer. De plus le comportement en milieu marin des bactéries pathogènes ou non fournira des indications sur la physiologie et le destin des bactéries immergées dans la mer. C'est pourquoi nous avons étudié la survie des bactéries anaérobies en eau de mer en choisissant pour cela les principaux représentants des différents groupes taxonomiques [2]. Toutes les souches utilisées proviennent de la collection de l'Institut Pasteur.

L'eau de mer qui a servi à ces expériences est de l'eau « âgée » suivant l'expression de C. E. Zobell [3], c'est-à-dire conservée deux mois à l'obscurité afin que soit stabilisé son contenu en matières organiques. Au moment de l'expérience, elle est répartie dans des tubes de verre à raison de 20 cm³ par tube, et stérilisée vingt minutes à 120° à l'autoclave.

Le pH de cette eau de mer après stérilisation était de 7,5 donc voisin de celui auquel sont habituées les bactéries utilisées. Dans les conditions naturelles, le pH de l'eau de mer peut atteindre 8-8,2.

Pour chaque germe on ensemence plusieurs tubes d'eau de mer avec chacun 0,5 à 1 cm³ d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon VF. Ces tubes sont ensuite étirés et scellés sous vide puis incubés à 26°.

Les bactéries telluriques et les parasites endogènes habitués à un milieu oligohalophile et essentiellement organique se trouvent brusquement transplantés dans un milieu salé et essentiellement minéral, la salinité moyenne de l'eau de mer étant de 36 g par litre et le contenu en matières organiques de 3 mg par litre, quantité qui se réduit pendant le « vieillissement » de l'eau de mer.

Les tubes sont ouverts stérilement à intervalles de temps réguliers et 1 cm³ de l'eau de mer contenant le germe est alors transplanté sur le milieu nutritif normal. La croissance du germe indique si la bactérie a résisté au passage en eau de mer. Son identité est vérifiée par

examen microscopique. On poursuit les repiquages jusqu'à ce qu'il n'y ait plus croissance. Les résultats obtenus jusqu'ici portent sur une période de six mois d'expériences. (La recherche de la résistance après un an en milieu marin n'est pas encore terminée.)

RÉSULTATS. — Ne résistent pas vingt-quatre heures :

Zuberella serpens, *Ramibacterium pseudo-ramosum*, *Dialister pneumosintes*, *Catenabacterium filamentosum*, *Acuformis perennis*, *Fusiformis fusiformis*, *Spherophorus ridiculosus*, *Fusocillus girans*.

Résistent quarante-huit heures :

Eubacterium cadaveris, *Inflabilis teras*, *Staphylococcus aerogenes*, *Vibrio crassus*, *Paraplectrum malenominatum*, *Veillonella parvula*.

Résiste huit jours :

Micrococcus variabilis.

Résistent quinze jours :

Cilibacterium moniliforme, *Clostridium gigas*.

Résiste un mois :

Actinobacterium baudetii.

Résistent six mois :

Streptococcus putridus, *Ristella insolita*, *Plectridium tetani*, *Pl. capitovalis*, *Pl. putreficum*, *Welchia perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Cl. caproicum*, *Cl. chauvoei*, *Cl. butyricum*, *Cl. botulinum A*, *Cl. botulinum B*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. hemolyticum*, *Cl. histolyticum*.

CONCLUSIONS. — 1^o Trente-trois espèces anaérobies ont été étudiées quant à leur survie en eau de mer. Dix-sept d'entre elles ont été tuées par l'eau de mer : il s'agissait surtout de bactéries endogènes non sporulées et fragiles par elles-mêmes, sauf *Inflabilis teras* et *Cl. gigas*, telluriques et sporulées.

2^o Une espèce non sporulée, *Act. baudetii*, a une résistance en eau de mer supérieure à sa longévité en milieux ordinaires.

3^o Quinze espèces résistent six mois et, parmi elles, deux espèces non sporulées, à longévité courte dans les milieux ordinaires, et 13 sporulées telluriques.

4^o Les anaérobies présentant une survie importante en eau de mer sont ceux qui vivent naturellement dans les sols et les eaux douces.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT. *Problèmes de bactériologie marine*. Conférence au C. R. E. O., février 1950.
- [2] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Bactéries Anaérobies*. 2^e édit., Masson, 1948.
- [3] C. E. ZOBELL. *Marine Bacteriology*, p. 58 ; *Chronica Bot. Comp.* Waltham, Mass., U. S. A., 1946.

ÉTUDE D'UNE SOUCHE DE *CL. SUBTERMINALE* (HALL ET WHITEHEAD) BERGEY

par I. PISU et N. ALADAME.

(*Laboratoire d'Hygiène de Milan
et Institut Pasteur, Service des Anaérobies.*)

Une intoxication alimentaire ayant atteint une centaine de personnes a été étudiée au laboratoire d'hygiène de Milan. L'aliment毒ique a été reconnu comme étant un rôti froid. Deux espèces bactériennes en ont été isolées : un staphylocoque blanc et un anaérobie strict. Ce dernier a été identifié comme une souche de *Cl. subterminale* (Hall et Whitehead) Bergey.

On sait que cette espèce très rare a été isolée de manioc africain en 1927 et jamais retrouvée depuis. Sa description est donc restée très sommaire. Nous avons pu compléter son étude de façon à la rendre classable et plus facilement déterminable.

Morphologie. — C'est un *Clostridium* typique, mesurant 2,8 μ sur 0,3 μ . On constate fréquemment des granulations disséminées dans les formes végétatives.

Physiologie. — Anaérobie strict se développant bien entre 30° et 37° et résistant deux minutes à 100°. Il réduit définitivement le rouge neutre et la phénosafranine et, temporairement, la safranine.

Cultures. — Gazogènes, mais non fétides ; simplement légèrement aromatiques.

En gélose profonde il donne de petites colonies lenticulaires et le dégagement gazeux est très abondant et disloque la gélose. En eau peptonée, culture très faible ; en bouillon glucosé, culture très rapide, trouble, gazogène avec dépôt. La gélatine est liquéfiée. Le lait est coagulé puis digéré. Les protéines coagulées ne sont pas attaquées.

Contrairement à la souche de Hall et Whitehead, la nôtre fait fermenter glucose, maltose, saccharose et lactose.

Caractères biochimiques. — Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites ; les sulfites sont réduits en SH₂ ; la fermentation du bouillon VF glucosé donne une acidité volatile totale de 1,161 g par litre. Il s'agit du mélange volatile acétique/butyrique = 1/2. Il y a production d'acide lactique en abondance.

L'ammoniaque produit est de 0,34 g par litre. Il existe aussi dans les cultures des amines volatiles, des aldéhydes, des alcools et des traces de SH₂.

Pouvoir pathogène. — Si on injecte 2 cm³ de culture jeune dans le muscle d'un cobaye, celui-ci présente, quarante-huit heures après, un léger œdème, puis une infiltration et une éventration de la paroi avec digestion des tissus. Mais la plaie finit par guérir et se cicatriser. Il ne se produit pas de toxine diffusible, ni d'hémolysine dans les cultures. Par contre, la réaction des lécithinases y a été positive. L'in-

jection intrapéritonéale de 0,5 cm³ à la souris provoque, après une période d'incubation de dix heures, de la diarrhée et, après vingt-quatre heures, la mort de 3 animaux sur 5. A l'autopsie, ceux-ci présentaient du météorisme.

Chez 2 jeunes chats (500 g), l'introduction par voie rectale de 2 cm³ de culture dans le gros intestin, à l'aide d'une petite sonde, a provoqué après dix heures d'incubation une diarrhée profuse avec fèces jaunes et écumeuses. Les témoins traités de la même façon avec *B. subtilis* n'ont présenté aucun symptôme.

Mais l'ingestion de culture du *Clostridium* par les cobayes et les souris n'a provoqué aucun symptôme d'intoxication.

Il semble donc que le *Clostridium* puisse exercer son action directement sur l'intestin, selon l'animal et la voie d'introduction, mais le pouvoir pathogène pour l'homme n'est pas encore sûrement démontré, bien qu'on puisse le supposer à cause du grand nombre de *Clostridium* trouvés dans la viande qui a provoqué l'intoxication (500 millions par gramme) vis-à-vis d'une quantité très petite de staphylocoques (5 000 par gramme).

Cette considération est aussi valable du fait que le déclenchement de l'intoxication humaine par la viande froide où le germe a été isolé a présenté une symptomatologie différente de l'intoxication staphylococcique, avec une période d'incubation de douze heures, très voisine de celle présentée par les animaux (souris et chats) soumis à l'épreuve expérimentale.

Position dans la systématique. — La souche étudiée ci-dessus constitue une variété glucidolytique de *Cl. subterminale*; c'est une espèce très voisine de *Cl. aerofaciendum* et nous la classons dans le groupe de *Cl. sporogenes* [sous-genre VII de Prévot] (1).

ÉTUDE DE QUELQUES SOUCHES DE BACILLES MÉSOPHILES SPORULÉS

par P. DE LAJUDIE

Nous avons étudié en 1950, à l'Institut Pasteur de Saigon, 22 souches de bacilles mésophiles sporulés en utilisant les techniques préconisées par Nathan R. Smith et ses collaborateurs [1, 2].

Origine des souches. — Ces souches n'ont fait l'objet d'aucune sélection; elles ont été prélevées au hasard de leur rencontre sur des milieux de culture ensemencés avec des produits pathologiques divers, humains ou animaux; elles ont été considérées comme des souillures provenant du milieu extérieur.

Toutes se développaient à la température du laboratoire (28° environ) aussi bien qu'à 41°5, sauf une souche de *B. polymyxa* et une de

(1) A.-R. PRÉVOT. *Manuel de classification des Anaérobies*, 2^e édit., 1948, 173.

B. circulans, qui poussaient très mal à cette dernière température. Pour des raisons matérielles, l'incubation à 45° et aux températures supérieures n'a pu être essayée.

Technique. — Nous avons adopté strictement les techniques et milieux recommandés par les auteurs américains pour la détermination des espèces. Cependant, la recherche de l'hydrolyse de l'amidon et de celle de la caséine sur plaques s'est montrée constamment négative ; de plus, les boîtes se contaminaien facilement ; nous n'avons pas pu tenir compte de ces résultats. Il en a été de même de la recherche de l'hydrolyse de la gélatine sur milieu de Hastings modifié ; nous avons dû revenir à la technique classique de culture en bouillon gélatiné en tubes de 18 mm et incubation à 37° ; l'hydrolyse est facilement appréciée par la persistance de la fluidité du milieu après séjour de quinze minutes à la glacière, un tube témoin se trouvant solidifié au bout de ce laps de temps.

Tous les germes pousserent en présence d'azote minéral dans le milieu d'Ayers et coll., qui donna d'excellents résultats pour l'étude des fermentations.

L'utilisation du citrate fut recherchée sur milieu de Koser-Simmons.

Résultats obtenus. — Toutes les cultures présentent des spores ovaïaires ou cylindriques ; elles appartiennent donc aux deux premiers groupes d'espèces du genre *Bacillus* ; aucune espèce du troisième groupe (spores rondes) n'a été rencontrée.

Les souches étudiées ont été identifiées comme suit :

- B. subtilis* : 12 souches (n°s 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10, 18, 19, 20, 21, 22) ;
- B. cereus* : 5 souches (n°s 4, 14, 15, 16, 17) ;
- B. pumilus* : 2 souches (n°s 3 et 9) ;
- B. polymyxa* : 1 souche (n° 12) ;
- B. circulans* : 1 souche (n° 11) ;
- B. megatherium* : 1 souche (n° 13).

Particularités et anomalies observées. — *B. megatherium*. — La souche étudiée présente, à la surface des colonies sur gélose, des gouttelettes d'aspect graisseux et produit sur pomme de terre un pigment rose franc.

B. cereus. — N. R. Smith et ses collaborateurs considèrent que *B. cereus* est bien plus fréquemment rencontré que *B. subtilis* ; c'est le contraire que nous avons observé, sur un nombre de cultures plus faibles, il est vrai.

Le principal élément de diagnostic entre ces deux espèces est la différence de diamètre, qui est de plus de 0,9 μ chez *B. cereus*, de moins de 0,9 μ chez *B. subtilis*. Or, les auteurs américains signalent que le diamètre du premier peut varier de 0,9 à 1,3 μ, et celui du second de 0,6 à 1 μ ; l'écart est donc très insuffisant pour permettre la différenciation, même en faisant la mensuration sur un grand nombre de germes, comme nous l'avons constaté plusieurs fois (*B. subtilis*, n°s 1, 6, 7 et 22 ; *B. cereus*, n°s 15 et 17 en particulier). Dans les cas litigieux, nous nous sommes basé pour la détermination sur les autres caractères : l'aspect vacuolaire (*B. cereus*) ou uniformément coloré (*B. subtilis*) du protoplasma après coloration à la fuchsine diluée, les caractères culturaux (bien que les deux espèces puissent présenter de nombreuses variations), et enfin les caractères biochimiques, notam-

ment les fermentations sucrées (xylose, arabinose et mannite sont attaqués en règle générale par *B. subtilis*, mais non par *B. cereus*).

Si les cellules de certaines souches ne dépassent guère 0,9 μ de diamètre, d'autres en revanche (souches n° 14 et 16) sont anormalement épaisses : 1,36 μ en moyenne, alors que les auteurs américains considèrent 1,3 μ comme diamètre maximum pour cette espèce.

La souche n° 16 donne une culture maigre sur pomme de terre ; la souche n° 17 pousse sur bouillon en formant un voile, sans troubler le liquide.

Au point de vue biochimique, la production d'acétyl-méthyl-carbinol s'est montrée tardive avec les souches n° 15 (huitième jour), n° 16 (dixième jour) et n° 14 (quinzième jour). Cette dernière, d'autre part, n'hydrolysaient complètement la gélatine qu'au bout de quinze jours.

B. subtilis. — Les éléments de la souche n° 10 n'ont que 0,55 μ de large en moyenne (le minimum observé par N. R. Smith était de 0,6 μ). Plusieurs cultures de cette espèce produisent des pigments : jaune (souche n° 2), chamois (n° 19), orangé virant progressivement au rouge (n° 5), jaune vert (n° 6). Les souches n° 1 et 20 fermentent le lactose, qui n'est généralement pas attaqué par cette espèce.

B. pumilus. — Les spores de la souche n° 3 sont anormalement minces, ne mesurant que 0,59 μ de diamètre moyen. La souche n° 9 appartient au type court, les éléments ont seulement 1 μ à 1,7 μ de long (1,4 μ en moyenne). Les deux cultures donnent de petites colonies coniques, lisses pour la souche n° 3, rugueuses pour la souche n° 9. Cette dernière, en outre, pousse mal sur pomme de terre. Les fermentations sucrées sont normales ; elles sont cependant assez lentes avec la souche n° 9.

B. circulans. — La souche n° 11, identifiée à *B. circulans*, a tous les caractères classiques de cette espèce, sauf l'aspect de la culture, qui n'a pas présenté les colonies tournantes mobiles caractéristiques sur gélose sèche ; d'ailleurs, le développement n'est pas extensif et les colonies, coniques, opaques et brillantes, sont de petites dimensions ; il s'agit donc d'une culture peu mobile.

Une première étude de 22 souches non sélectionnées de bacilles sporulés mésophiles nous a permis d'identifier 6 espèces différentes, dont certaines ont d'ailleurs des caractères atypiques.

Ceci fait entrevoir l'intérêt que présenterait, en Indochine, une étude systématique et plus complète de ce groupe bactérien et, en particulier, la recherche des propriétés antibiotiques, dont de nombreuses espèces du genre *Bacillus* ont fait la preuve lorsqu'elles ont été prospectées sur d'autres continents.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. R. SMITH, R. E. GORDON et F. E. CLARK. U. S. Dept. of Agriculture, *Miscell. Pub.*, n° 559, May 1946.
- [2] N. R. SMITH. *J. Bact.*, 1947, **53**, 45.

**COMPORTEMENT
DES AGGLUTININES, DES PRÉCIPITINES
ET DES ANTICORPS INCOMPLETS
AU COURS DE L'IMMUNISATION DE LAPINS
PAR LE SÉRUM HUMAIN**

par KONRAD HÜMMEL,

présentée par A. EYQUEM.

(Institut d'Hygiène de l'Université de Fribourg-en-Brisgau.)

Cette étude a été réalisée sur le sérum de 20 lapins répartis en trois lots :

1^o 9 lapins ont été immunisés par trois à cinq injections intramusculaires à sept jours d'intervalle.

2^o 5 lapins ont reçu trois à cinq injections intraveineuses à cinq jours d'intervalle.

3^o 6 lapins ont été immunisés d'abord par voie intraveineuse, puis réimmunisés par trois à cinq injections intramusculaires espacées de cinq à sept jours.

L'étude a porté sur l'évolution du titre des agglutinines, des précipitines, des anticorps incomplets (anticorps bloquants, agglutinoïdes, cryptagglutinoïdes et « aggloïdes »). (Dénomination de Hummel.)

Les résultats ont montré que le mode d'immunisation n'a pas d'influence sur le titre des différents anticorps. Les précipitines seules semblent, chez les animaux immunisés par voie intraveineuse, atteindre plus tôt leur maximum.

Avant l'immunisation, les sérums n'avaient pas de précipitines normales contre l'albumine humaine, mais dans la plupart des cas, il y avait une agglutinine d'un titre de 1/2 à 1/16. Les agglutinoïdes testés en milieu albumineux (technique de Diamond et Denton) n'étaient pas décelables avant l'immunisation. La recherche des cryptagglutinoïdes à l'aide du test « T » met en évidence une panagglutinine de Thomsen titrant 1/32 à 1/64, qui n'est absorbée que par les globules rouges transformés possédant l'antigène T. Les titres spécifiques trouvés à l'aide du « Kollidon » (Hummel) lors de la recherche des « aggloïdes », atteignent, en moyenne, 1/500 à 1/2 000 avant l'immunisation.

Au cours de l'immunisation, les différents anticorps se sont comportés de la façon suivante :

1^o *Agglutinines.* — La montée du titre des agglutinines s'est effectuée en général régulièrement et a commencé du deuxième au quatrième jour. Le maximum a été atteint en général trois semaines après le début de l'immunisation. Dans la moitié des cas, le titre

maximum est resté constant encore assez longtemps, dans les autres cas le titre a diminué immédiatement après l'atteinte du maximum ; trente-six jours après la fin de l'immunisation, les titres de départ étaient en général de nouveau atteints.

2^o *Anticorps bloquants.* — Lors des recherches sur les anticorps bloquants, on a renoncé au « blocking test » de Wiener et on n'a recherché que la présence des prozones. Cette méthode se justifiait, puisque Hill et ses collaborateurs ont constaté que les anticorps bloquants apparaissent passagèrement au cours de l'immunisation. Il n'a pas été possible d'établir si les phénomènes de zone observés étaient causés par l'effet inhibiteur de l'agglutination dû à l'hémolyse (qui était presque toujours présente dans les premiers tubes) ou par des anticorps bloquants (fixant ou ne fixant pas le complément). En tout cas, on a constaté que l'hémolyse n'était pas l'unique cause des prozones.

3^o *Agglutinoïdes.* — Il n'est possible de conclure à la présence de ces anticorps que lorsque les titres en milieu albumineux sont de deux ou trois dilutions supérieurs aux titres de la réaction d'agglutination. 9 animaux n'ont absolument *jamais* présenté de réaction positive en milieu albumineux ; 9 autres ont présenté passagèrement des agglutinoïdes et ceci, la plupart du temps, à peu près à l'époque du titre maximum des agglutinines. Dans 2 cas, on a pu constater l'existence d'un anticorps actif en milieu albumineux dont le titre est resté constant du dix-huitième au vingt-quatrième jour après le début de l'immunisation, puis a disparu au trente-sixième jour.

4^o *Cryptagglutinoïdes.* — Les titres de ces anticorps montent à partir du deuxième au quatrième jour, relativement rapidement, et atteignent leur maximum en général plus tôt que les agglutinines. A leur maximum, ces titres étaient en moyenne sept à huit fois supérieurs au titre original (l'augmentation réelle du titre atteint, en fait, huit à douze fois, puisque le titre original obtenu par cette réaction représente la valeur de « l'agglutinine T »). Huit jours après l'atteinte du maximum, les titres commencent en général à descendre, pour être, trente-six jours après la dernière immunisation, encore une à deux fois supérieurs au taux de départ.

5^o *Aggloïdes.* — Chez le lapin, les aggloïdes normaux envers les globules rouges humains ont en moyenne un titre de 1/500 à 1/2 000. Au deuxième-quatrième jour après le début de l'immunisation, les titres des aggloïdes commencent à monter et atteignent, à peu près en même temps que les Cryptagglutinoïdes, leur maximum. Celui-ci était de sept à huit fois supérieur à la valeur de départ. Après avoir atteint le maximum, les titres commencent en général à descendre lentement pour être au trente-sixième jour après la dernière immunisation, deux à trois fois supérieurs à la valeur originelle.

6^o *Précipitines.* — Le titre des précipitines a été déterminé par le procédé a. La méthode de détermination se différencie de celle de la détermination des titres des anticorps agglutinants, en ce qu'une comparaison directe avec ceux-ci n'est pas possible d'emblée. Les précipitines sont d'abord décelables, dans la règle, au cinquième-septième jour, à une dilution d'antigène de 1/50 ; le titre monte régulièrement et atteint son maximum après tous les autres anticorps

examinés, soit quatre à cinq semaines après le début de l'immunisation. A ce moment, les titres atteignent en moyenne une valeur dix fois supérieure à celle du départ. Après avoir atteint son maximum, le titre des précipitines tombe très lentement, et le trente-sixième jour, après la dernière immunisation, est en moyenne six à huit fois supérieur au titre originel. En comparant le titre de précipitation avec les taux des anticorps agglutinants, on constate en premier lieu une relation avec les cryptagglutinoïdes et les aggroïdes.

Les recherches que nous rapportons ont montré que les titres des types d'anticorps se comportent de manière individuelle au cours de l'immunisation. La division en 4 fractions différentes doit donc subsister à juste raison. Le « hiatus » en anticorps constaté primitivement dans les sérums normaux entre les agglutinines et les « aggroïdes » a été comblé par l'immunisation grâce à l'apparition des « agglutinoïdes » et « cryptagglutinoïdes ». La présence de cryptagglutinoïdes et d'agglutinoïdes semble donc pathognomonique d'une immunisation.

BIBLIOGRAPHIE

HUMMEL. *Zentralbl. Bakter.*, 1951, **156**, 176.
 DIAMOND et DENTON. *J. Lab. clin. Med.*, 1945, **30**, 821.
 HUMMEL. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1951, **108**, 233.
 THOMSEN. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1927, **52**, 85.
 HUMMEL. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1950, **107**, 418.
 HUMMEL et HAMBURGER. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1951, **108**, 357.
 HILL, HABERMAN et JONES. *Blood*, 1948, **3**, suppl. 2, 80.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Sur les principes de classification des staphylocoques par la méthode des phages, par R. WAHL et J. FOUCHE.

Une nouvelle méthode de différenciation des variétés de « Brucella » ; action du diéthyldithiocarbamate de soude (DEDTC), par G. RENOUX.

Contribution à l'étude du métabolisme des acides aminés soufrés, et spécialement de la méthionine, dans le sol, par M^{me} H. DE BARJAC.

Flore intestinale des sujets traités par les antibiotiques, par J. BRISOU et A. ARDISSON.

Etude des réactions sérologiques et sanguines utilisées pour le diagnostic des pneumopathies aiguës dites « primitives atypiques » (P.A.P.) observées en France, par R. SOHIER, M. MOREL, J. BUISSIÈRE, I. ESSER-TRIMBERGER et J. JUILLARD.

LIVRES REÇUS

M. M. Murray, J. A. Ryle, B. W. Simpson et D. C. Wilson. — *Thyroid enlargement and other changes related to the mineral content of drinking water (with a note on goitre prophylaxis)*. Medical Research Council, Memorandum n° 18, 1 vol., 39 p., His Majesty's Stationery Office, London, 1948. Prix : 1 s. 6 d.

Enquête effectuée en Angleterre sur les rapports entre l'hypertrophie de la glande thyroïde et la teneur de l'eau en iodé, et qui a porté sur 6 000 écoliers de tous âges et sur les 575 habitants d'un village d'une région à goitres. Les auteurs ont d'abord mis au point une méthode permettant d'évaluer avec exactitude les dimensions des glandes thyroïdes et de classer celles-ci en quatre catégories. Un rapport a pu être établi entre la teneur de l'eau en iodé et la fréquence du goitre ; cependant le rôle joué par l'iodé de l'eau de boisson dépend aussi du degré de dureté de cette eau. Le plus grand nombre de goitres dans certaines régions d'Angleterre par rapport à des régions d'Ecosse dont l'eau a la même teneur en iodé peut être attribué au degré de dureté des eaux anglaises, plus grand que celui des eaux d'Ecosse. La répartition du goitre suivant l'âge et le sexe est exposée et discutée. Enfin de nouvelles preuves sont apportées en ce qui concerne l'association du crétinisme et de la surdi-mutité avec le goitre. Les auteurs conseillent d'ajouter des sels d'iodé au sel de cuisine en Angleterre.

H. T.

G. L. Brown. — *Chance and design in physiological research*. Lewis and C° Ltd, London, 1951, 14 pages. Prix : 3 sh.

Leçon d'inauguration faite par le Prof. Brown lors de sa nomination à l'Université de Londres. Il y définit les buts du physiologiste et les facilités que les nouveaux équipements et les nouvelles techniques ont mis à sa disposition ces dernières années. Il tient également à rappeler, d'autre part, le rôle que la chance et le hasard ont joué et joueront sans doute toujours dans les découvertes scientifiques. Enfin il souligne l'utilité pour les jeunes physiologistes anglais non seulement des stages dans les laboratoires des pays étrangers, mais aussi des séjours, qui devraient être plus faciles à réaliser, dans les laboratoires de leur propre pays.

H. T.

H. B. May et J. R. Marrack. — *Clinical pathology*, 6^e édition, 1 vol., 512 p., 16 pl. dont 10 en couleurs et 28 fig. dans le texte, J. et A. Churchill, éd., Londres 1951. Prix : 30 sh.

Manuel destiné aux praticiens et divisé en huit sections : I. Hématologie (étude du sang normal et pathologique, groupes sanguins, technique de la ponction lombaire). II. Chimie (composition du sang, de l'urine, etc., vitamines, hormones). III. Bactériologie et immunité. IV. Champignons et autres parasites. V. Examen des expectorations

et du liquide céphalo-rachidien. VI. Etude de certains états pathologiques (diarrhée, fièvre, coma, ictere, etc.). VII. Réaction de la grossesse. VIII. Méthodes histologiques (coupes, colorations, préparation des tissus).

H. T.

P. L. Mollison. — *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1951, 456 pages. Prix : 37 s. 6 d.

La technique de transfusion sanguine a subi une évolution profonde sous l'influence de l'expérience de la guerre. Un livre comme celui de Mollison nous apporte l'état le plus récent de la question et donne une remarquable vue d'ensemble du sujet. Clairement présenté, bien illustré, avec une bibliographie compréhensive, il peut être cité en exemple pour la façon dont sont traités aussi bien les aspects théoriques que le point de vue pratique de la transfusion sanguine.

La liste des chapitres est éloquente de ce point de vue et dispense d'autres commentaires.

Chapitre I. — La survie des différents composants du sang après la transfusion.

Chapitre II. — Volume sanguin : mesure, détermination et variation.

Chapitre III. — Hémorragie et transfusion.

Chapitre IV. — Transfusion et anémie.

Chapitre V. — La transfusion en tant que méthode d'étude de la durée de vie des globules rouges.

Chapitre VI. — Groupes sanguins et antigènes normaux.

Chapitre VII. — Formation des iso-anticorps, identification des anticorps anormaux ; relations antigéniques des facteurs de groupes sanguins.

Chapitre VIII. — Méthode de détermination des groupes sanguins.

Chapitre IX. — Incompatibilités ou circonstances abrégant la vie des globules rouges.

Chapitre X. — Réactions hémolytiques consécutives aux transfusions.

Chapitre XI. — Autres effets défavorables des transfusions.

Chapitre XII. — Hématologie du nouveau-né et indications de la transfusion.

Chapitre XIII. — Perméabilité placentaire et maladie hémolytique du nouveau-né.

Vingt-cinq pages de références terminent cet ouvrage hautement recommandable.

P. L.

W. Annandale Troup. — *The Rational treatment of catarrh*, Chaterson Ltd, 5 Johnson's Court, Fleet Street, London E. C. 4., 1951, 85 pages. Prix : 10 s. 6 d.

Clair et bien présenté, ce livre s'adresse essentiellement aux otorhino-laryngologistes qui y trouveront l'exposé des traitements modernes des catarrhes des voies respiratoires supérieures couramment employés par les praticiens britanniques.

P. L.

AVIS

Sur l'initiative du Gouvernement italien et sous la direction scientifique et technique de la *Commission Internationale des Industries Agricoles* doit se réunir, à Rome, du 23 au 31 mai 1952, le

IX^e CONGRES INTERNATIONAL DES INDUSTRIES AGRICOLES

Cette manifestation a pour objet :

1^o L'étude et la discussion des problèmes d'ordre scientifique, technique et économique intéressant les industries biologiques, agricoles et alimentaires.

2^o La diffusion des connaissances scientifiques et des réalisations pratiques acquises dans ces industries.

Parmi les questions inscrites à l'ordre du jour pour être discutées par priorité au cours du Congrès, citons :

Facteurs de croissance et synthèse protéique.

Propriétés des membranes cellulaires, en relation avec les systèmes d'extraction.

Les bactéries dans la synthèse des protéines.

L'usage des produits phyto-pharmaceutiques. Leur influence sur la qualité des produits agricoles, ainsi que sur les cultures associées voisines et de l'assoulement.

La pollution des eaux de surface par les eaux résiduaires industrielles.

Le rouissage microbiologique et chimique dans la production et l'amélioration des fibres textiles naturelles.

Parmi les personnalités qui sont inscrites pour traiter ces questions, nous relevons, entre autres, les noms du Dr CHAIN, du Professeur von EULER et du Professeur Louis DE BROGLIE, tous trois prix Nobel.

Pour tous renseignements, s'adresser au Professeur MARILLER, délégué général du « Comité Permanent d'Organisation de la Section Française des Congrès Internationaux des Industries Agricoles », ou à Monsieur Max DIETLIN, secrétaire général du Comité, 18, avenue de Villars. Paris (VII^e).

Le Gérant : G. MASSON.